

AUS DER ABTEILUNG FÜR VERGLEICHENDE NEUROBIOLOGIE
DER UNIVERSITÄT ULM
(LEITER: PROFESSOR DR. JOST BERNHARD WALTHER)

angefertigt unter:
PROFESSOR DR. KLAUS-PETER HOFFMANN

vorgelegt über das:

INSTITUT FÜR TIERPATHOLOGIE DER LUDWIG-MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT MÜNCHEN, LEHRSTUHL FÜR ALLGEMEINE
PATHOLOGIE UND NEUROPATHOLOGIE
(VORSTAND: PROFESSOR DR. MED. VET. ERWIN DAHME)

IMMUNCYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN GABAERGER STRUKTUREN
IM MESENCEPHALEN PRAETECTUM DER KATZE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Beate Schildknecht
aus Ulm/Do.

München 1987 ⁸



AUS DER ABTEILUNG FÜR VERGLEICHENDE NEUROBIOLOGIE
DER UNIVERSITÄT ULM
(LEITER: PROFESSOR DR. JOST BERNHARD WALTHER)

angefertigt unter:
PROFESSOR DR. KLAUS-PETER HOFFMANN

vorgelegt über das:

INSTITUT FÜR TIERPATHOLOGIE DER LUDWIG-MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT MÜNCHEN, LEHRSTUHL FÜR ALLGEMEINE
PATHOLOGIE UND NEUROPATHOLOGIE
(VORSTAND: PROFESSOR DR. MED. VET. ERWIN DAHME)

IMMUNCYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN GABAERGER STRUKTUREN
IM MESENCEPHALEN PRÄTENTUM DER KATZE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Beate Schildknecht
aus Ulm/Do.

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. W. Rüsse

Referent: Prof. Dr. E. Dahme

Korreferent: Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1.	Der optokinetische Reflex (OKR)	1
2.	Der Nucleus tractus optici (NOT)	3
2.1.	Anatomie	3
2.2.	Physiologie	6
2.3.	Afferenzen	8
2.3.1.	Der retinale Eingang	9
2.3.2.	Der corticale Eingang	10
2.4.	Efferenzen	13
3.	Problemstellung	16
3.1.	Neurotransmitter	17
3.2.	Immunocytochemie	21
3.2.1.	Prinzip der Methode	22
3.3.	Fragestellung	25
B	Material und Methoden	27
1.	Injektionen	27
2.	Histologische Aufarbeitung	29
2.1.	Perfusion	29
2.2.	Histochemischer MRP-Nachweis	31
2.3.	Harzstufen und Einbettung (Post-Embedding)	33
2.4.	GABA-Immunocytochemie	36
2.5.	Auswertung	38
2.5.1.	Injektionsstellen	38
2.5.2.	Retrograd markierte Neurone	39
2.5.3.	GABA-Immunocytochemie	39
C	Ergebnisse	41
1.	GABA-immunreaktive Zellelemente	41
1.1.	GABA-immunreaktive Neurone	41
1.2.	GABA-immunreaktive Terminalen	44
2.	Doppelmarkierung	46
2.1.	Referenzstrukturen	49

2.2.	Injektionsstellen und retrograd markierte Neurone	52
2.2.1.	NOT-Projektionsneurone und GABA-Immunocytochemie	56
2.2.2.	Nicht markierte Neurone und GABA-Immunocytochemie	59
3.	Quantitative Analyse der Terminalendichte	61
3.1.	Quantitative Terminalenverteilung in unmittelbarer Nachbarschaft der Neurone des NOT bzw. Colliculus superior	61
3.1.1.	Die Analyse der NOT-Projektionsneurone	61
3.1.1.1.	Somata der NOT-Projektionsneurone	63
3.1.1.2.	Proximale Dendriten der NOT-Projektionsneurone	64
3.1.2.	Die Analyse von nicht retrograd markierten Neuronen im NOT	68
3.1.3.	Die Analyse der Neurone im SGI des Colliculus superior	69
4.	Vergleichende Ergebnisse der Terminalenverteilung Zellpopulationen des NOT - SGI des Colliculus superior	72
D	Diskussion	75
1.	Histologie	75
1.1.	Injektionsstelle der Oliva inferior	75
1.2.	Retrograde Markierung - Doppelmarkierung	76
1.3.	GABA-Immunocytochemie	79
1.4.	Post-Embedding-Methode	85
2.	GABA-immunreaktive Strukturen im NOT	88
2.1.	GABA-immunreaktive Neurone im NOT	88
2.2.	GABA-immunreaktive Terminalen im NOT	89
3.	Wirkungsmechanismus von GABA - Aufbau und Funktion seiner Rezeptoren	92
3.1.	GABA-Rezeptoren	92
3.2.	Gabaerg kontrollierte Ionenkanäle	93
3.3.	Agonisten und Antagonisten	94
3.3.1.	Muscimol als selektiver GABA _A -Agonist	95
3.3.2.	Bicucullin als selektiver GABA-Antagonist	96

3.3.3.	Picrotoxin als nicht-kompetetiver GABA-Antagonist	96
3.3.4.	Endogene Inhibitoren	98
4.	Neuropharmakologie	100
5.	Inhibitorische Interneurone im NOT - ein Funktionsmodell	105
6.	Richtungsspezifität	110
6.1.	Richtungsspezifitätsmodelle	110
E	Zusammenfassung	117
	Summary	119
F	Anhang	121
G	Literaturverzeichnis	128

Abkürzungsverzeichnis

a	=	anterior
AOS	=	akzessorisches optisches System
AOT	=	akzessorischer optischer Trakt
Aq	=	Aquedukt
BIN	=	Nucleus brachii collicuculis inferioris
BSA	=	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BSC	=	Brachium colliculis superioris
CS	=	Colliculus superior
DAB	=	Diaminobenzidin
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DTN	=	dorsaler terminaler Nucleus
FTC	=	central tegmental field
GABA	=	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD	=	Glutamatdecarboxylase
GOD	=	Glucose-Oxidase
HY	=	Hanker-Yates-Reagenz
IgG	=	Immunglobulinfraktion G
IPC	=	central interpeduncular nucleus
LC	=	central linear Nucleus of the raphe
LG	=	Corpus geniculatum laterale
LGd	=	Corpus geniculatum laterale dorsalis
LGv	=	Corpus geniculatum laterale ventralis
LTN	=	lateral terminaler Nucleus
MG	=	Corpus geniculatum mediale
MLB	=	medial longitudinal bundle
MRP	=	Meerrettich-Peroxidase
MTN	=	medial terminaler Nucleus
NOT	=	Nucleus tractus optici
NOTl	=	Nucleus tractus optici pars lateralis
NOTm	=	Nucleus tractus optici pars medialis
NPH	=	Nucleus praepositus hypoglossi
NRTP	=	Nucleus reticularis tegmenti pontis
NSS	=	Normalschweineserum

OI	=	Oliva inferior
OKR	=	optokinetischer Reflex
OKN	=	optokinetischer Nystagmus
P	=	posterior
PAG	=	periaquaeductal gray
PBS	=	Phosphatpuffer mit NaCl (phosphat buffer salted)
PAC		Nucleus praetectalis anterior pars compacta
PAR	=	Nucleus praetectalis anterior pars reticularis
PAP	=	Peroxidase-Antiperoxidase
PM	=	Nucleus praetectalis medialis
PO	=	Nucleus praetectalis olivaris
PP	=	Nucleus praetectalis posterior
PT	=	Praetectum
R	=	Nucleus ruber
RT	=	Raumtemperatur
SC	=	Colliculus superior
SCS=SGS	=	Stratum griseum superficiale des SC
SCI=SGI	=	Stratum griseum intermediale des SC
SCD=SGP	=	Stratum griseum profundum des SC
SNc	=	Substantia nigra pars compacta
SN	=	Substantia nigra pars reticularis
SO	=	Stratum opticum
TBS	=	Tris-Puffer mit NaCl
TMB	=	Tetramethylbenzidin
TO	=	Tractus opticus
VC	=	visueller Cortex

A Einleitung

1. Der Optokinetische Reflex (OKR)

Bei allen Vertebraten führen Bewegungen der visuellen Umwelt reflektorisch zu Kopf- und Augenbewegungen mit dem Ziel, die retinale Bildverschiebung - den 'retinalen Slip' - auf ein Minimum zu beschränken.

Der optokinetische Reflex stellt bei höheren Säugetieren, insbesondere beim Primaten und beim Menschen, einen komplex organisierten Schaltkreis dar. Er führt zur Bildstabilisierung der bewegten Umwelt auf der Retina und schafft so die Voraussetzung für eine optimale visuelle Informationsverarbeitung. Sein Eingangsreiz ist die retinale Slip-Geschwindigkeit.

Als Folge einer langanhaltenden, gleichförmigen Umweltbewegung tritt der optokinetische Nystagmus (OKN) auf. Dieser ist charakterisiert durch eine langsame, der Umweltbewegung folgenden Phase, an welche sich schnelle sakkadische Rückstellbewegungen anschließen.

Der horizontale optokinetische Nystagmus kann bei monokularer visueller Stimulation prinzipiell in zwei Komponenten zerlegt werden: den temporalen und den nasalen OKN.

Vom temporalen OKN spricht man, wenn der visuelle Stimulus von nasal nach temporal im Gesichtsfeld des offenen Auges bewegt wird, und vom nasalen OKN bei entgegengesetzter, also temporonasaler Bewegungsrichtung des optokinetischen Reizes.

Sind temporale sowie nasale Komponente gleich stark ausgeprägt, ist der OKN symmetrisch.

Der Quotient aus der Geschwindigkeit der langsamen Folgephase und der Reizgeschwindigkeit des visuellen Stimulus ist als 'Gain-Wert' definiert ($\text{Gain} = \frac{\text{Augengeschwindigkeit}}{\text{Reizgeschwindigkeit}}$).



In Untersuchungen an verschiedenen Spezies wurde gezeigt, daß mit zunehmendem Entwicklungsstand des visuellen Systems wesentliche Unterschiede in der Ausprägung und der Ausführung des OKN auftreten.

So können niedere Säuger wie das Kaninchen (Collewyn, 1969) nur auf verhältnismäßig langsame visuelle Stimuli gut mit Augenfolgebewegungen antworten, während höhere Säugtiere wie die Katze (Evinger und Fuchs, 1978) und vor allem Primaten (Cohen, 1977) noch bei sehr hohen Reizgeschwindigkeiten reagieren, also weitaus größere Gain-Werte erreichen.

Außer den Unterschieden im Geschwindigkeitstuning zeigen die einzelnen Spezies auch Diskrepanzen hinsichtlich der Symmetrie des OKN.

Niedere Säuger wie die Ratte (Cazin et al, 1980a) und das Kaninchen (Collewyn, 1969) zeigen nach monokularer Reizung einen asymmetrischen OKN, d.h. nur bei Bewegung des Reizes in temporonasaler Richtung reagieren diese Spezies mit einer reflektorischen Augenbewegung, während eine Reizung in Gegenrichtung (= nasotemporal) kaum oder gar nicht beantwortet wird.

Mit zunehmender Evolution des visuellen Systems wird die nasotemporale Komponente jedoch ausgeprägter, sodaß der OKN bei höheren Säugern fast vollkommen symmetrisch ist.

Bei der Katze ist die Symmetrie des OKN noch an relativ niedere bis mittlere Reizgeschwindigkeiten gebunden, d.h., bei sehr hohen Reizgeschwindigkeiten überwiegt die temporonasale Komponente (Markner und Hoffmann, 1985), während Primaten und auch der Mensch über einen völlig symmetrischen, geschwindigkeitsunabhängigen OKN verfügen (Affe: Pasik und Pasik, 1984).

2. Der Nucleus tractus optici (NOT)

Der NOT, eine kleine, zum mesencephalen Praetectum zählende Kernstruktur, nimmt im Schaltkreis des OKN eine zentrale Stellung ein.

Die ersten Hinweise auf diese wichtige Funktion des NOT wurden durch neurophysiologische Untersuchungen am Kaninchen (Collewyn, 1975a) und an der Katze (Hoffmann und Schoppmann, 1975) erbracht. Weitere Studien (Ratte: Cazin et al., 1980; Katze: Precht und Strata, 1980) bestätigten diesen Befund.

2.1 Anatomie

Das Praetectum setzt sich aus mehreren Kernen zusammen und erstreckt sich vom caudalen Ende des Thalamus bis zum rostralen Bereich des Colliculus superior im Mittelhirn.

Nach Kanaseki und Sprague (1974) unterscheidet man sieben praetectale Kerngebiete, welche rein anatomischen Kriterien zufolge nicht immer eindeutig gegeneinander abgrenzbar sind.

Bei der Katze erscheinen von rostral nach caudal zunächst die beiden Teile des Nucleus praetectalis anterior (PA), (Pars compacta (PAc) und Pars reticularis (PAr)). Ebenfalls am rostralen Pol des Praetectums, jedoch weiter medial liegt der Nucleus praetectalis medialis (PM).

Etwas weiter lateral schließt sich dann der Nucleus praetectalis olivaris (PO) an.

Der Nucleus praetectalis posterior (PP) dehnt sich nahezu über die gesamte Länge des Praetectums aus und ist medial vom PA gelegen.

Der Nucleus tractus optici (NOT) liegt am dorsalen und caudalen Rand des Praetectums. Er kann nach Avendano und Juretschke (1980) in eine Pars medialis (NOTm) und eine Pars lateralis (NOTl) unterteilt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Projektionsneurone lassen sich durch retrograde Markierung von der dorsalen Kappe der unteren Olive darstellen (Hoffmann et al., 1976). Die Neurone liegen als aufgelockertes Zellband oberflächlich und unregelmäßig zerstreut im lateralen Ast des Brachium colliculis superioris.

Der siebte Kern, der Nucleus praetectalis subopticus ist am caudalen Pol des Praetectums gelegen.

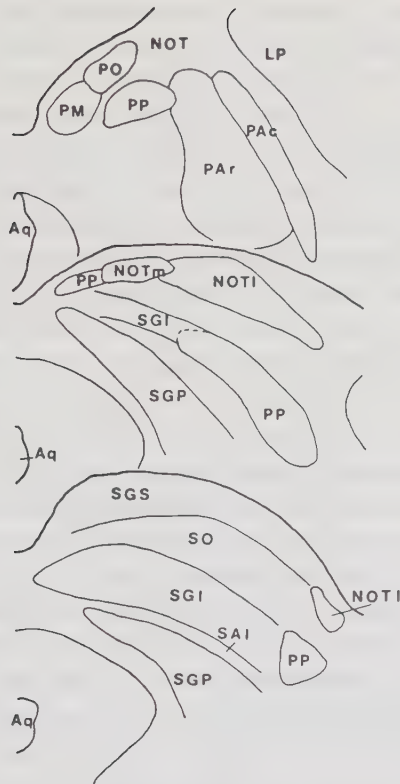


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Schnittserie durch das Praetectum der Katze (nach Avendano und Juretschke, 1980). Oben: rostral; unten: caudal.

PM: Nucleus praetectalis medialis; PAR: Nucleus praetectalis anterior pars reticularis; PAC: Nucleus praetectalis anterior pars compacta; NOTm: Nucleus tractus optici pars medialis; NOTl: Nucleus tractus optici pars lateralis; andere Abkürzungen : siehe Verzeichnis.

2.2. Physiologie

Durch elektrophysiologische Studien an verschiedenen Spezies (Kaninchen: Collewyn 1975b; Ratte: Cazin et al, 1980a,b,c; Katze: Hoffmann und Schoppmann, 1975; Affe: Hoffmann und Distler, 1986) konnte eine Neuronenpopulation im NOT nachgewiesen werden, welche durch ganz bestimmte Antworteigenschaften bei optokinetischer Stimulation charakterisiert ist. Der Geschwindigkeitsbereich, in dem die Zellen auf bewegte visuelle Reize antworten, variiert von $0.1^\circ/\text{s}$ bis über einige $100^\circ/\text{s}$ und steht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Entwicklungsgrad des visuellen Systems der jeweils untersuchten Spezies.

So antworten die NOT-Neurone beim Kaninchen (Collewyn, 1975b) und bei der Ratte (Cazin et al, 1980a,b,c) nur auf langsame Bildverschiebungen von 0.1° – $10^\circ/\text{s}$, während die NOT-Neurone der Katze (Hoffmann und Schoppmann, 1981) und des Affen (Hoffmann und Distler, 1986) noch bei Geschwindigkeiten von 100° bzw. $300^\circ/\text{s}$ reagieren.

Die NOT-Neurone sind während der langsamen Phase des OKN aktiviert. Ihre Entladungsrate steigt dabei proportional zur retinalen Slip-Geschwindigkeit an und sie werden deshalb auch als 'retinale Slip-Neurone' bezeichnet (Hoffmann, 1981).

Die wohl auffallendste Eigenschaft dieser NOT-Neurone ist ihre Richtungsspezifität. Als optimaler visueller Stimulus dient dabei ein großflächiges, kontrastreiches Muster, welches langsam in Vorzugsrichtung über das Gesichtsfeld des kontralateralen Auges bewegt wird (Hoffmann und Schoppmann, 1975). Eine horizontale Reizmusterverschiebung in temporonasaler Richtung hat demnach eine Erhöhung der Spontanaktivität dieser Neuronengruppe zur Folge. Umgekehrt bewirkt eine gleichartige Bewegung in Gegenrichtung (also Nullrichtung) ein Absinken ihrer Aktivität unter das Spontanniveau. Mit anderen Worten : NOT-Neurone der linken Hemisphäre bevorzugen Bewegungen nach

links, NOT-Neurone der rechten Hemisphäre bevorzugen Bewegungen nach rechts (Katze: Hoffmann und Schoppmann, 1981; Affe: Hoffmann und Distler, 1986).

Bei der Ratte werden ca. 50% der richtungsspezifischen Neurone durch Bewegung in Nullrichtung nicht inhibiert, sondern behalten ihre ohnedies niedere Spontanrate bei (Cazin et al, 1980a,b,c).

Alle NOT-Neurone lassen sich vom kontralateralen Auge aus aktivieren. Bei der Katze zeigen ungefähr die Hälfte der NOT-Neurone (Hoffmann und Schoppmann, 1981), beim Affen alle (Hoffmann und Distler, 1986) binokulare Erregbarkeit, d.h., die NOT-Neurone einer Seite können von beiden Augen aus aktiviert werden.

Neuesten Untersuchungen zufolge können sogar relativ kleine visuelle Stimuli ($5 \times 5^\circ$ Sehwinkel bei der Katze, beim Affen noch kleiner) die Spontanrate der NOT-Zellen beeinflussen. Voraussetzung ist jedoch, daß diese über die Area centralis oder Fovea geführt werden (Hoffmann und Distler, 1986).

Durch neurophysiologische Untersuchungen konnte am NOT der Katze eine zweite Klasse praetectaler Neurone beschrieben werden (Schoppmann und Hoffmann, 1979).

Diese sogenannten 'Jerk-Neurone' liegen nicht ganz so oberflächlich, sondern etwas tiefer im Praetectum als die NOT-Projektionsneurone (Ballas und Hoffmann, 1985).

Sie besitzen große rezeptive Felder und einheitliche elektrophysiologische Eigenschaften. Sie zeigen keinen bestimmten Schwellenwert in ihrer Antwort und die meisten Jerk-Neurone antworten nicht richtungsspezifisch. Sie reagieren nur auf visuelle Stimuli, die mit hoher Geschwindigkeit (bis $800^\circ/\text{s}$) bzw. ruckartig über eine große Distanz im Gesichtsfeld bewegt werden und zeigen geschwindigkeits-

unabhängige, maximale Entladungsraten, sogenannte 'bursts' (Ballas und Hoffmann, 1985).

Jerk-Neurone sind binokular erregbar (Schoppmann und Hoffmann, 1979).

Soweit untersucht, erhalten diese Jerk-Neurone direkten retinalen Eingang von schnell leitenden Y-Fasern (Ballas und Hoffmann, 1985); ihre Zellmorphologie sowie ihre efferenten Verbindungen sind noch weitgehend ungeklärt.

2.3. Afferenzen

Der NOT erhält sowohl retinale als auch corticale Projektionen, deren Ausprägung und Bedeutung bei den verschiedenen Spezies allerdings stark variiert.

So spielen die retinalen Eingänge nur noch bei niederen Säugern wie Nagern eine einflußreiche Rolle, während sie bei höheren Säugetieren wie der Katze oder den Primaten mehr und mehr von der corticalen Komponente überlagert werden. Diese ursprünglich dominierende retinale Projektion ist hier nur noch während einer postnatalen Prägungsphase funktionell bedeutsam (Hoffmann, 1987).

Sowohl die Untersuchungen der corticalen wie auch der retinalen Projektionen liefern Anhaltspunkte, welche zur Klärung der komplexen Zusammenhänge beim Zustandekommen des richtungsspezifischen Antwortverhaltens der NOT-Neurone herangezogen werden können.

2.3.1. Der retinale Eingang

Durch elektrische Reizung des Nervus opticus und Ableitung im NOT konnten die zum NOT projizierenden retinalen Fasern identifiziert werden.

Diesen Untersuchungen zufolge (Ratte: Scalia, 1972; Scalia und Arango, 1979; Kaninchen: Takahashi und Oyster, 1980; Collewyn und Holstege, 1984; Katze: Hoffmann und Schoppmann, 1975; Ballas et al., 1981) erhält der NOT retinalen Eingang von langsam leitenden W-Fasern, welche über das Brachium colliculis superioris ausschließlich vom kontralateralen Auge her projizieren (Fukuda und Stone, 1974; Hoffmann und Schoppmann, 1975 & 1981).

Spekulationen über einen evtl. vorhandenen ipsilateralen Eingang aufgrund anatomischer Studien (Ballas et al., 1981) konnten durch elektrophysiologische Untersuchungen bisher nicht bestätigt werden.

Ungefähr 25% der retinalen Ganglienzellen beim Kaninchen sind richtungsspezifisch (Oyster und Barlow, 1967). Nur ein geringer Prozentsatz projiziert davon zum NOT.

Vergleichbare richtungsspezifische Ganglienzellen wurden auch in der Katzenretina entdeckt, doch macht deren Anteil an der gesamten Ganglienzellpopulation nur ca. 1% aus und sie zeigen richtungsspezifisches Antwortverhalten nicht nur für horizontal-, sondern auch für vertikal bewegte Reizmuster (Hoffmann und Stone, 1985).

Diese richtungsspezifischen Ganglienzellen reagieren durchweg nur bei langsamen Reizgeschwindigkeiten bis 20°/s (Hoffmann, 1983a).

2.3.2. Der corticale Eingang

Wie bereits erwähnt, besitzen höhere Säuger wie Katze und Affe die Fähigkeit, auf sehr schnell bewegte Reizmuster zu antworten, welche das geschwindigkeitsbezogene Reaktionsvermögen der retinalen Ganglienzellen bei weitem übertrifft. Desweiteren sind ca. die Hälfte der NOT-Zelle der Katze bzw. alle beim Affen binokular erregbar.

Diese Phänomene lassen sich durch das Vorhandensein einer stark ausgeprägten corticopraetectalen Projektion erklären.

Zusätzlich zur kontralateralen retinalen Projektion existiert bei höheren Säugetieren nämlich ein ipsilateraler Eingang aus den corticalen Arealen 17 und 18. Durch antidrome Reizung vom NOT aus konnten diese corticopraetectalen Neurone als Pyramidenzellen mit komplexen rezeptiven Feldern in der Schicht V des visuellen Cortex identifiziert werden (Schoppmann, 1981). Sie zeigen durchweg binokulare Erregbarkeit sowie richtungsspezifisches Antwortverhalten, die Vorzugsrichtungen unterscheiden sich jedoch von Zelle zu Zelle - wobei allerdings eine geringgradige Präferenz für Horizontalbewegungen zu bestehen scheint (Schoppmann, 1981).

Diese corticalen Neurone sind sowohl während der langsamen als auch der schnellen Phase des OKN aktiviert (Schoppmann, 1981; Hoffmann et al., 1984). Von diesen richtungsspezifischen Pyramidenzellen kann ein großer Teil (41%) auf sehr schnell bewegte visuelle Stimuli antworten - bis über 100°/s. Diese schnell reagierenden Zellen befinden sich vor allem in Area 18 (Hoffmann et al, 1984).

Diese zweite, corticale Projektion schafft also die Voraussetzung für die binokulare Erregbarkeit der NOT-Neurone sowie für deren Fähigkeit, auf schnelle Reizmuster-verschiebungen zu reagieren.

Eine abschließende Gegenüberstellung der Einflüsse, die die retinalen bzw. corticalen Projektionen bei den verschiedenen Spezies auf das Antwortverhalten der NOT-Neurone ausüben, läßt klar erkennen, daß mit zunehmender Evolution des Säugerhirns der corticale Eingang dominierender wird und die NOT-Neurone in ihrem Antwortverhalten dem corticalen Eingang viel mehr unterworfen sind als dem retinalen.

Diese Beobachtung wird durch Läsions- und Deprivationsexperimente bestätigt.

Corticale Läsionen (also Ausschalten der corticopraetectalen Projektion) führen zum Unvermögen der NOT-Neurone, auf Reizgeschwindigkeiten von über $20^\circ/\text{s}$ zu reagieren und zum Verlust der Binokularität; d.h., die NOT-Zellen sind dann nur noch vom kontralateralen Auge aus aktivierbar (Hoffmann, 1981). Monokulare Reizung hat dann auch bei sehr langsamen Reizgeschwindigkeiten eine Asymmetrie des OKN zur Folge (Wood et al., 1973; Strong et al., 1984).

Die Richtungsspezifität der NOT-Zellen bleibt jedoch unbeeinflusst.

Frühe visuelle Deprivation eines Auges während der 'sensitiven Phase' (den ersten drei Lebensmonaten bei der Katze bzw. den ersten sechs bis zwölf Lebensmonaten bei Primaten) führt zum völligen Verlust der binokularen Erregbarkeit aller NOT-Neurone (Hoffmann, 1979; 1983b) - d.h.: sämtliche NOT-Zellen können nur noch vom kontralateralen Auge aus aktiviert werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob das kontralaterale Auge depriviert war oder das ipsilaterale.

Analog zum Phänomen nach corticalen Läsionen ist die Fähigkeit, auf schnelle Reizgeschwindigkeiten zu reagieren dahingehend modifiziert, daß nur noch die NOT-Neurone, die vom normalsichtigen, also nicht deprivierten Auge aus aktiviert werden, auf schnelle Stimuli antworten. Die vom deprivierten Auge getriebenen Neurone können dagegen nicht mehr auf schnelle Reize modulieren.

Entsprechende Beobachtungen wurden durch Untersuchungen an schielenden Katzen gemacht : die vom schielenden Auge aus aktivierten NOT-Neurone können nicht mehr auf schnelle Reize reagieren (Cynader und Hoffmann, 1981).

Wichtig bleibt festzuhalten, daß die Richtungs-spezifität der NOT-Zellen sowohl nach corticalen Läsionen als auch nach visueller Deprivation sowie bei schielenden Tieren erhalten bleibt - also unabhängig von visueller Erfahrung zu sein scheint.

Eine genetische Verankerung und damit eine von postnatalen visuellen Erfahrungsreizen unabhängige Manifestation wird auch für die Organisation des direkten retinalen Eingangs postuliert (Hoffmann, 1987). Da diese Projektionen ihre Funktionstüchtigkeit auch nach früher visueller Deprivation nicht verlieren, geht man davon aus, daß sie im Zuge der embryonalen Entwicklung des ZNS bereits fertig angelegt werden.

Oft bildet sich die endgültige Gestalt eines Systems jedoch erst allmählich aus der noch amorphen Struktur seiner Anlage - so verhält es sich wahrscheinlich auch mit den corticalen Bahnen. Diese bedürfen zur Ausbildung und Konsolidierung ihrer Synapsen und damit zur Erlangung ihrer praedestinierten Funktionen erst bestimmter Stimulation. Sie sind in einer als 'sensitiven Phase' definierten Zeitspanne der frühkindlichen Entwicklung auf die Einwirkung visueller Erfahrungsreize angewiesen. Geschieht dies nicht - wie z.B. bei schielenden oder visuell deprivierten Individuen - so

resultiert als Folge der noch ungenügend ausdifferenzierten Verbindungsbahnen ein generelles Unvermögen, auf schnell bewegte Reizstimuli binokular zu antworten.

2.4. Efferenzen

Die NOT-Neurone projizieren ihrerseits in verschiedene Kerngebiete des Hirnstamms, welche alle an der Steuerung von Stabilisierungsreflexen für Augen, Kopf und Körper beteiligt sind.

Eine wichtige Zielstruktur ist die dorsale Kappe der Oliva inferior. Dies wurde durch anatomische und physiologische Untersuchungen an verschiedenen Spezies bestätigt (Ratte: Terasawa et al., 1979; Kaninchen: Maekawa und Simpson, 1973; Katze: Hoffmann et al., 1976; Walberg et al., 1981; Affe: Sekiya und Kawamura, 1985). Sie erhält Eingang vorwiegend vom ipsilateralen NOT.

Von der dorsalen Kappe der unteren Olive aus ziehen deren Neurone, den Kletterfasereingang formierend, zum kontralateralen Flocculus. Die cerebellären Purkinjezellen projizieren ihrerseits auf die Neurone der ipsilateralen Vestibulariskerne. Die Vestibulariskerne leiten die Information nun auf die Motoneurone der Augenmuskelkerne III, IV und VI weiter (Büttner-Ennever, 1981).

Somit wäre ein möglicher, für die Funktion des OKN relevanter Schaltkreis geschlossen. Die Vestibulariskerne erhalten ihre visuelle Information jedoch nicht ausschließlich über die cerebelläre Projektion - dies zeigen Läsionsexperimente am Flocculus, welche keine qualitativen Ausfallserscheinungen am OKN zur Folge haben (Keller und Precht, 1979; Cazin et al., 1980a). Lediglich ein Absinken des 'Gain-Wertes' für die nasotemporale Richtung ist zu

verzeichnen, wenn der visuelle Stimulus über das Gesichtsfeld des kontralateralen Auges geführt wird (Barmack und Simpson, 1980).

Weitere, für die Funktion des OKN wichtige, nachgeschaltete Kerngebiete sind der Nucleus praepositus hypoglossi NPH (Ratte: Cazin et al., 1982; Katze: Magnin et al., 1983), von wo aus ebenfalls die Vestibulariskerne erreicht werden können, - und der Nucleus reticularis tegmenti pontis NRTP (Cazin et al., 1982; Terasawa et al., 1979). Von ihm aus projizieren Moosfasern zum kontralateralen Flocculus (Cazin et al., 1982; Myashita et al., 1980) und zum ipsilateralen NPH (Cazin et al., 1982; Magnin et al., 1983) und ermöglichen so einen indirekten Zugang zu den Vestibulariskernen (Hoffmann et al., 1976; Lannou et al., 1984; Maekawa et al., 1985).

Eine direkte Projektion vom NOT zum Nucleus abducens soll beim Kaninchen (Holstege und Collewyn, 1982) und beim Affen existieren (Weber und Harting, 1980). Direkte Verbindungen zwischen den primären sensorischen Kernen und dem Nucleus oculomotorius sind sonst nur bei primitiven Vertebraten wie dem Frosch (Brecha und Karten, 1979) und der Taube (Precht, 1981) nachgewiesen worden.

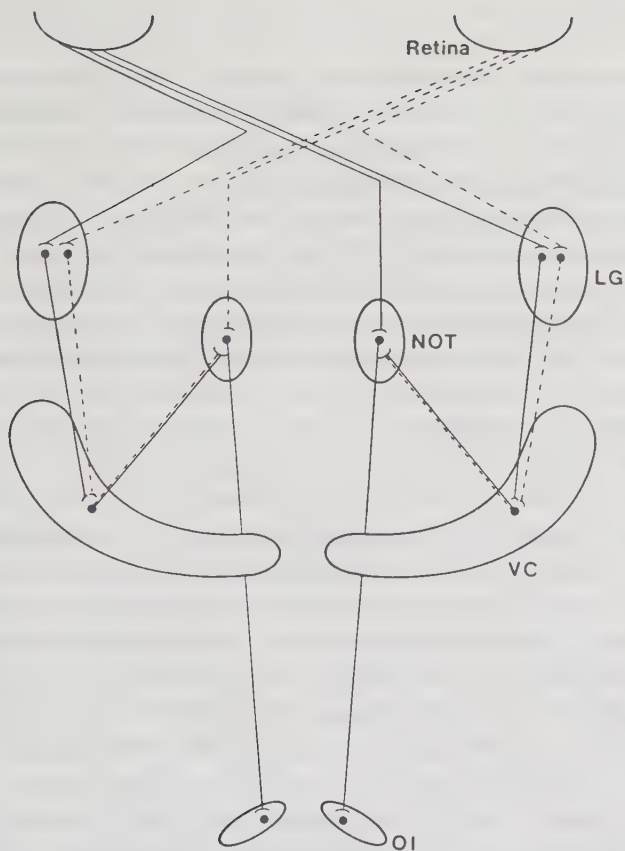


Abb. 2: Schematische Darstellung des retinalen und corticalen Eingangs zum NOT und des Ausgangs zur Oliva inferior (nach Hoffmann, 1983).

3. Problemstellung

Die Frage, welcher Mechanismus die Richtungsspezifität der NOT-Zellen bewerkstelligt, bleibt trotz den geschilderten Untersuchungen ungeklärt.

Zum einen besteht die Möglichkeit, daß das richtungsspezifische Antwortverhalten der NOT-Neurone das Ergebnis lokaler Verschaltungen - z.B. in Form inhibitorischer Interneurone - darstellt; zum anderen wäre aber auch denkbar, daß deren typische Antworteigenschaften durch die retinalen und /oder die corticalen Afferenzen bereits vorprogrammiert sind - sich also unabhängig von lokalen inhibitorischen Mechanismen entwickeln.

Die meisten Organismen mit Sehvermögen sind für die Bewegungsrichtung eines visuellen Reizes empfindlich. So gibt es z.B. richtungsspezifische Ganglienzellen in der Retina, welche auf das Erkennen von Bewegung in einer bestimmten Richtung spezialisiert sind. Dieses Phaenomen wurde erstmals von Barlow und Levick (1965) durch Untersuchungen am Kaninchenauge entdeckt.

Schon lange wird versucht, dieses richtungsselektive Verhalten einer bestimmten Neuronenpopulation anhand neurophysiologischer und neuropharmakologischer Untersuchungen zu klären. Die aus solchen Studien resultierenden Theorien und Modelle, welche erst in der Diskussion genauer ausgeführt werden sollen, setzen für das Zustandekommen der Richtungsspezifität meist das Vorhandensein inhibitorischer Mechanismen voraus.

Im Zusammenhang mit der Forderung nach inhibitorischen Schaltmechanismen stellt sich vor allem auch die Frage nach der Identität des Neurotransmitters, den diese Systeme vorzugsweise benutzen. Auf diese Thematik will ich im folgenden Kapitel kurz eingehen.

3.1. Neurotransmitter

Grundsätzlich wird zwischen inhibitorisch und exzitatorisch wirkenden Transmittersubstanzen unterschieden, doch viele Neurotransmitter können je nach Lokalisation an verschiedenen Stellen des ZNS die eine oder die andere Wirkung entfalten. Der Effekt einer Transmittersubstanz hängt vor allem von der Eigenschaft der postsynaptischen Membran und damit vom Charakter der postsynaptischen Rezeptoren ab.

Von zahlreichen Substanzen weiß oder vermutet man, daß sie im ZNS als Neurotransmitter wirksam sind. Vor allem in den letzten Jahren hat man in der Charakterisierung solcher Transmittersubstanzen, in der Aufklärung ihres Verteilungsmusters im ZNS und in der Analyse der molekularen Vorgänge bei der chemischen Signalübertragung über Synapsen beträchtliche Fortschritte erzielt. Dank solcher Untersuchungen weiß man auch, daß der Wirkungsmechanismus zahlreicher Pharmaka und Neurotoxine darauf beruht, diese chemische Signalübertragung zu unterbrechen, zu verändern oder nachzuahmen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß bei vielen zentralnervösen Erkrankungen die Ursache in Defekten der chemischen Impulsweiterleitung im ZNS liegt.

Der bedeutendste Transmitter mit inhibitorischer Wirkung im ZNS höherer Vertebraten ist zweifelsohne Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) - eine Aminosäure, die nicht in Proteinen auftritt und nahezu ausschließlich im Gehirn und Rückenmark synthetisiert wird. Sie vermittelt dort sowohl die prae- als auch die postsynaptische Hemmung (genauereres s. Diskussion). Im Vertebratenhirn am sichersten nachgewiesen ist GABA als Transmitter der Purkinjezellen des Cerebellums (Snyder, 1975).

Seine Synthese erfolgt durch Decarboxylierung des exzitatorischen Transmitters L-Glutamat mit Hilfe des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD). Die Hauptmenge des GABA-

Vorläufers Glutamat wird durch Transaminierung aus dem α -Ketoglutarat gewonnen, womit eine Verbindung zum Citratcyclus hergestellt ist.

Der Abbau von GABA erfolgt über eine Transaminierung, wobei die NH_2 -Gruppe unter Bildung von Glutamat auf ein weiteres Molekül α -Ketoglutarat übertragen wird.

GABA-Synthese und -Abbau stellen also Schleifen des Citratcyclus dar. Dieses Phaenomen wird auch als 'GABA-Shunt' beschrieben (Siesjö, 1978).

Während die Synthese von GABA in den inhibitorischen Neuronen selbst stattfindet, erfolgt sein Abbau in erster Linie durch Gliazellen. Nach der Aufnahme von GABA in die Gliazelle wird es über Glutamat zu Glutamin umgewandelt und steht nach Ausschleußung in den synaptischen Spalt dem Neuron als Vorstufe für die erneute Transmittersynthese zur Verfügung (Iversen und Kelly, 1975).

Neuerdings wird GABA auch mit dem Wirkungsmechanismus bestimmter Psychopharmaka in Verbindung gebracht, die wie das Valium zur Gruppe der Benzodiazepine gehören. Man vermutet eine Interaktion dieser Pharmaka mit GABA-Rezeptoren im ZNS in der Weise, daß sie die Wirkung von GABA potenzieren (Andrews und Johnston, 1979; Simmonds, 1983).

Zu den GABA-Antagonisten werden die Stammhirnkonvulsiva Picrotoxin und Bicucullin gerechnet. Diese führen durch Aufhebung der inhibitorischen Wirkung GABA-erger Neurone zur ungehemmten Aktivität der betroffenen Bahnen.

Als Pharmakon mit agonistischer Wirkung ist Muscimol, das Gift des Fliegenpilzes, bekannt.

Der Wirkungsmechanismus von GABA beruht im Prinzip auf einer Hyperpolarisation bzw. zumindest auf einer Stabilisierung des Ruhemembranpotentials. Dies wird erreicht durch eine Erhöhung der Chloridionen-Leitfähigkeit. GABA-Rezeptoren scheinen demnach mit Chlorid-Ionenkanälen eng assoziiert zu sein (genauer s. Diskussion).

Während GABA bei Säugetieren vorwiegend als Neurotransmitter des ZNS wirksam ist und dort sowohl die prae- als auch die postsynaptische Hemmung vermittelt, ist diese Aminosäure z.B. bei Parasiten auch im peripheren Nervensystem von Bedeutung. Das machte man sich bei der Entwicklung von bestimmten Präparaten zur Parasitenbekämpfung zunutze. Als Beispiel sei an dieser Stelle der Wirkstoff 'Ivermectin' aufgeführt. Ivermectin = 22,23-Dihydroavermectin B₁ ist ein chemisch modifiziertes Fermentationsprodukt des Aktinomyceten 'Streptomyces avermitilis' mit antiparasitärer Wirkung. Es wird der Gruppe der Endektozide zugerechnet, da es sowohl gegen Endo- als auch Ektoparasiten, die GABA als Transmitter besitzen, eingesetzt werden kann. Ivermectin fördert hier vor allem praesynaptisch die Freisetzung des inhibitorisch wirkenden Überträgerstoffes GABA und dessen Bindung an postsynaptische Rezeptoren.

So wird bei Nematoden die Signalübertragung von den Interneuronen des ventralen Stranges auf die exzitatorischen motorischen Neurone gehemmt.

An Arthropoden hemmt Ivermectin die Reizübertragung an neuromuskulären Synapsen durch die verstärkte Wirkung von GABA. Die Parasiten werden gelähmt und schließlich abgetötet (Berninghaus, 1986).

Ein weiterer, GABA-ähnlicher Transmitter ist Glycin. Rein anatomisch lassen sich die beiden Aminosäuren Glycin und GABA - wenn auch nicht immer exakt abgrenzbar - in unterschiedlichen Bereichen des ZNS lokalisieren. Glycin kommt in erster Linie im Rückenmark und im Stammhirn vor, während GABA hauptsächlich in den darüber liegenden Regionen zu finden ist (Snyder, 1975).

Weitere, wichtige - zumeist exzitatorisch wirksame Transmittersubstanzen des ZNS sind:

Acetylcholin- - zudem ein bedeutender Transmitter des vegetativen Nervensystems. So sind sämtliche praeganglionären Neurone des vegetativen Nervensystems cholinergen Charakters, ebenso sämtliche postganglionären Neurone des Parasympathikus.

Die sympathisch innervierten Blutgefäße der Kopfhaut sowie die postganglionären sympathischen Neurone zu den Schweißdrüsen sind ebenfalls cholinerg.

Acetylcholin fungiert zudem als Transmitter an der neuromuskulären Endplatte.

Am Beispiel des Acetylcholins läßt sich die unterschiedliche Wirkungsweise eines Transmitters, welche in erster Linie von der Eigenschaft der postsynaptischen Membran abhängig ist, gut demonstrieren: so wirkt Acetylcholin an der motorischen Endplatte erregend, am Herzmuskel als Transmitter des Parasympathikus jedoch hemmend, vor allem negativ chronotrop - Abnahme der Sinusfrequenz, negativ inotrop - Nachlassen der Kontraktionskraft (Krnjevic, 1974).

Ähnliche Doppelfunktionen gelten für die Transmitter Dopamin und Serotonin welche zusammen mit Noradrenalin zur Gruppe der Monoamine gerechnet werden. Durch diese Sammelbezeichnung soll ausgedrückt werden, daß diese Substanzen jeweils eine Aminogruppe besitzen. Sie weisen jedoch sonst keine chemischen Gemeinsamkeiten auf.

Noradrenalinhaltige Nervenzellen treten vor allem im Nucleus coeruleus des Hirnstamms auf. Außerdem ist Noradrenalin der Transmitter der postganglionären Neurone des sympathischen Nervensystems mit Ausnahme der beim Acetylcholin erwähnten Fälle (Burnstock und Costa, 1975).

Im ZNS soll es an der Erhaltung des Wachzustandes, am Träumen und an der Regulation der Stimmungslage beteiligt sein.

Serotoninhaltige Nervenzellen findet man vor allem in den Raphe-Nuclei, einem Gebiet des Hirnstamms. Ihre Fasern reichen in den Thalamus, den Hypothalamus sowie in viele andere Hirnregionen.

Serotonin ist an der Regulation der Körpertemperatur, an der Empfindungswahrnehmung sowie an der Schlafregulation beteiligt (Iversen, 1979).

Als ubiquitäre, exzitatorische Transmitter des ZNS gelten die Aminosäuren Glutamat und Aspartat.

Desweiteren sei das Neuropeptid 'Substanz P' erwähnt, welches vor allem der sensorischen Reizleitung dienen soll - und eine Gruppe opiat-ähnlicher Peptide, die 'Enkephaline', welche zumindest modulatorische Funktionen hinsichtlich der Schmerzempfindung erfüllen. Ein potentieller Antagonismus 'Substanz P' - 'Enkephaline' wird diskutiert (Fredrickson, 1977).

3.2. Immuncytochemie

Die Chemie der Signalübertragung im Gehirn ist außerordentlich schwer zu untersuchen, denn die Neurotransmitter sind nur in winzigen Mengen vorhanden und das Hirngewebe ist chemisch und strukturell sehr komplex.

Seit einiger Zeit versucht man mit Hilfe von neuropharmakologischen und histochemischen Techniken die Transmittereigenschaften bestimmter neuronaler Systeme zu analysieren, um dadurch dann genauere Information über die funktionellen Zusammenhänge dieser Systeme zu erhalten.

Einen weitreichenden Fortschritt erzielte man mit der Entwicklung immunhistochemischer Techniken, die es gestatten, Nervenzellen, die einen bestimmten Transmitter enthalten, selektiv zu färben. Dadurch erhält man Auskunft über die quantitative und qualitative Verteilung bestimmter Neurotransmitter in den verschiedenen Kerngebieten des Gehirns.

So lassen sich gabaerge Strukturen unter Anwendung von Antikörpern, die entweder das Syntheseezym GAD oder den Transmitter GABA selbst als Antigen erkennen durch Sichtbarmachung des Antigen/Antikörperkomplexes immunhistochemisch darstellen.

3.2.1. Prinzip der Methode

Zur Sichtbarmachung des Antigen/Antikörperkomplexes habe ich die von Sternberger (1979) entwickelte Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) - Technik angewandt, welche ausschließlich auf immunologischen Bindungen beruht.

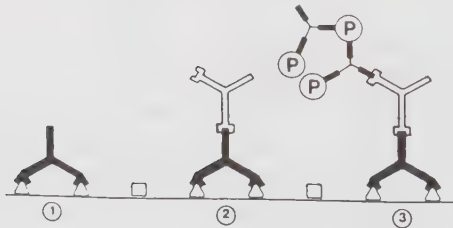


Abb. 3: Prinzip des Immunocytochemischen Nachweisverfahrens unter Anwendung der PAP-Methode (nach Pickel, 1981; genaueres siehe Text).

Die immunhistochemische Darstellung gabaerger Strukturen nach der PAP - Methode besteht grundsätzlich aus drei Schritten :

1. Die Einführung eines spezifischen Antikörpers gegen das zu analysierende Antigen im Gewebe.

2. Die Reaktion mit einem Antiserum, das gegen die Immunglobulinfraction G (IgG) des Tieres gerichtet ist, aus dem der erste Antikörper isoliert wurde.

3. Die Einführung des PAP-Komplexes. Der PAP-Komplex ist eine pentagonale Struktur, in der zwei Moleküle Antiperoxidase mit drei Molekülen Peroxidase immunologisch verknüpft sind. Die Peroxidase kann mit Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen sichtbar gemacht werden.

Mit Hilfe der eben beschriebenen immunocytochemischen Verfahren konnten GABA-positive Strukturen in verschiedenen Kerngebieten des Vertebratengehirns dargestellt werden.

Eine immunocytochemische Studie am Colliculus superior der Katze beschreibt einen massiven Besatz der tiefen Colliculusneurone im Stratum griseum intermedium (SGI) mit GAD-positiven Terminalen (Lu et al., 1985) und demonstriert somit den starken Einfluß, den GABA auf diese Neurone ausübt.

Auch im Perigeniculatum der Katze wird die Existenz zahlreicher GAD-positiver Neurone nachgewiesen (Montero und Singer, 1984), welche zum Corpus geniculatum laterale projizieren (Ahlsen und Lindström, 1978).

Desweiteren gibt es bereits einige Arbeiten über das qualitative Vorkommen und die quantitative Verteilung gabaerger Strukturen im NOT bei verschiedenen Tierarten. Zu diesen Studien wurden entweder GAD-Antikörper (Ratte: Mugnaini und Oertel, 1985; Giolli et al., 1985; Kaninchen: Penney et al., 1983; Katze: Weber und Chen, 1984) oder GABA-Antikörper (Ratte: Ottersen und Storm-Mathisen, 1984; Horn und Hoffmann, 1987; Katze und Affe: Horn und Hoffmann, 1987) verwendet.

Diesen Untersuchungen zufolge trifft man im Bereich des NOT eine relativ große Anzahl gabaerger Strukturen an, wie z.B. GABA-immunreaktive Neurone und Terminalen.

Die quantitative Verteilung dieser Strukturen wird von den verschiedenen Autoren nicht ganz einheitlich beschrieben.

So liegt der prozentuale Anteil von GABA-positiven Neuronen an der Gesamtneuronenpopulation des NOT bei der Ratte zwischen 30% (Horn und Hoffmann, 1987) und 50% (Mugnaini und Oertel, 1985) und bei der Katze zwischen 29% (Horn und Hoffmann, 1987) und 10% (Weber und Chen, 1984).

Eine relativ hohe Dichte gabaerger Terminalen im NOT wurde von sämtlichen Autoren bestätigt.

Diese Terminalen liegen - Untersuchungen an dickeren Vibratomschnitten zufolge - in z.T. enger räumlicher Beziehung zu den NOT-Projektionsneuronen (Horn und Hoffmann, 1987). Der Nachweis für einen massiven Terminalenbesatz, wie er etwa bei den tiefen Colliculusneuronen beschrieben ist, konnte jedoch in keiner der bisherigen Untersuchungen erbracht werden.

Genausowenig konnte eine objektivierbare Aussage über die Terminalendichte an den Somata bzw. Dendriten der NOT-Projektionsneurone getroffen werden, da die Schnittdicke (20-50µm) und die limitierte Eindringtiefe des Antiserums eine vollständige, quantitative Erfassung der einzelnen Terminalen nicht gestattete.

3.3. Fragestellung

Die Frage danach, ob - und wenn ja - welchen Einfluß die eben beschriebenen GABA-positiven Strukturen auf NOT-Projektionsneurone ausüben und ob sie eventuell am Zustandekommen des richtungsspezifischen Antwortverhaltens dieser Neuronenpopulation maßgeblich beteiligt sind, oder ob sie andere - vielleicht nur modulatorische Funktionen erfüllen - bleibt durch bisherige Untersuchungen unbeantwortet.

Wenn die Richtungsselektivität der NOT-Neurone nicht schon durch die retinalen und/oder corticalen Afferenzen vorgegeben ist, sondern durch im NOT-Bereich lokalisierte Verschaltungen - z.B. in Form von inhibitorischen Interneuronen - bewerkstelligt wird, so kann die Existenz gabaerger Terminalen postuliert werden, welche die Somata und die Dendriten der NOT-Output-Neurone in relativ hoher Dichte besetzen.

Dabei erfolgt der Nachweis eines direkten gabaergen Eingangs - bedingt durch die limitierte Eindringtiefe der Antikörperseren und auf Grund der feinstrukturierten Anatomie des zu untersuchenden Materials vorteilhafterweise an Semidünnschnitten (Schnittdicke 1µm) .

In elektronenmikroskopischen Studien konnten die meisten der direkt am Soma bzw. Dendriten eines Neurons lokalisierten GABA-positiven 'Punkte' als axosomatische bzw. axodendritische Synapsen identifiziert werden (Ribak et al., 1979) .

Durch eine quantitative Analyse der Terminalendichte an bzw. um die Somata und Dendriten der NOT-Projektionsneurone unter Anwendung der 'Post- embedding' - Methode (s. Material und Methoden) und eines GABA-Antiserums sollen durch die

lichtoptische Darstellung gabaerger Strukturen in Semidünnschnitten folgende Fragen geklärt werden:

1. Knüpfen gabaerge Terminalen synaptische Kontakte zu NOT-Projektionsneuronen ?

2. Wenn ein gabaerger Eingang auf NOT-Projektionsneurone nachzuweisen ist, in welchem quantitativen Verhältnis steht er dann zu Systemen mit bekanntermaßen starkem gabaergen 'Input' wie z.B. die Neurone des Stratum griseum intermedium des Colliculus superior ?

3. Besteht ein unterschiedliches Verteilungsmuster bezüglich der Terminalendichte um NOT-Projektionsneurone im Vergleich zu anderen Neuronenpopulationen des Praetectums ?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die richtungsselektiven NOT-Neurone durch eine Meerrettich-Peroxidase (MRP) - Injektion in die dorsale Kappe der Oliva inferior retrograd markiert und anschließend durch eine Tetramethylbenzidin (TMB) - Nachweisreaktion sichtbar gemacht.

Die Darstellung der gabaergen Neurone und Terminalen erfolgte an Hand immunocytochemischer Techniken unter Anwendung eines GABA-Antikörpers (Fa. Immuno Nuclear) an semidünn geschnittenem Material (Schnittdicke: 1µm) nach der Kunstharzeinbettung (Postembedding-Methode).

Durch Anwendung einer modifizierten Doppelmarkierungsmethode sollte die gleichzeitige Darstellung von retrograd markierten NOT-Projektionsneuronen und gabaergen Zellelementen im histologischen Bild gelingen.

B. Material und Methoden

Die Ergebnisse dieser Arbeit stammen aus Experimenten mit vier 2 bis 3kg schweren Katzen. Die Tiere wurden von der Zentralen Tierversuchsanlage der Universität Ulm bezogen.

Soweit die Art der Experimente es zuließ und der Erfolg eines jeden Experiments nicht durch die Kombination zweier Experimente in Frage gestellt wurde, habe ich meine Untersuchungen an Tieren durchgeführt, die bereits in anderweitigen Versuchen eingesetzt waren und an denen ich die für meine Analysen notwendigen Areale des Mittelhirns (NOT-Bereich, Colliculus superior) für die anschließende histologische Aufarbeitung entnehmen konnte.

Alle Tiere erhielten beidseitige stereotaktische Druckinjektionen einer 30%igen MRP-Lösung in die Oliva inferior zur retrograden Markierung der NOT-Projektionsneurone.

1. Injektionen

Nach einer Praemedikation von 0.5 ml Atropin/Tier (Parasympatholytikum) wurden die Versuchstiere mit Ketavet® (20 mg/kg KGW) in Kombination mit Rompun® (0,2 mg/kg KGW) in der Mischspritze narkotisiert. Die Applikation erfolgte subcutan, um einer zu schnellen Anflutung v. a. des Ketavet und damit dem Eintreten eines Atemstillstandes vorzubeugen. Zur weiteren, dosierten Ketavet-Applikation während Operationsdauer wurde ein Venenkatheter gelegt.

Nach Eintreten der Narkose wurde das Versuchstier intubiert und mit einem Gasgemisch ($N_2O:O_2 = 3:1$) künstlich beatmet.

Durch die Kombination Injektions-/Inhalationsnarkose war eine tiefe Anaesthesie sowie eine ausreichende Analgesie während der gesamten Dauer des operativen Eingriffs gewährleistet.

Die Temperaturüberwachung erfolgte über ein Rektalthermometer, außerdem wurde die Körpertemperatur durch ein um das Versuchstier gelegtes Heizkissen reguliert.

Herzschlagfrequenz, Pulsqualität, Atmung sowie expiratorische CO_2 -Werte wurden in regelmäßigen Abständen überprüft.

Die stereotaktischen Druckinjektionen in die Oliva inferior wurden vom Betreuer durchgeführt.

Nach oberflächlicher Anaesthesie des äußeren Gehörgangs mit Xylokain® und sorgfältiger Rasur, Reinigung und Desinfektion des Hinterhaupt- und Nackenbereiches wurde das Versuchstier in einem Stereotaxiegerät fixiert.

Nun mußte durch vorsichtige Präparation der Nackenmuskulatur das Hinterhauptsloch dargestellt und unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops die Dura mater durchtrennt werden.

Eine mit einer 30%igen MRP-Lösung (in 1%igem Dimethylsulfoxyd, gelöst in aqua bidest) gefüllte Hamilton-Mikroliterspritze wurde in einen Mikromanipulator eingespannt und so plazierte, daß der endgültige Injektionswinkel 45° betrug. Nach nochmaliger Kontrolle der Spitze auf exakte Platzierung und Durchgängigkeit ihres Lumens wurde diese unter oben angegebenem Winkel an die endgültige Injektionsstelle geführt.

Die genaue Bestimmung des Injektionsortes erfolgte stereotaktisch durch Berechnung der Horsley-Clarke-Koordinaten. Als Orientierungshilfe diente dabei die hintere Spitze des IV. Ventrikels.

Injiziert wurden jeweils 0.3 ml einer 30%igen MRP-Lösung in 1%igem Dimethylsulfoxyd, gelöst in aqua bidest, über 20 - 30 Minuten, in zwei Schüben.

Nach der Injektion beließ man die Hamilton-Mikroliterspritze noch ca. 10 Minuten am Ort, um ein

Hochsteigen der Injektionslösung im Stichkanal zu vermeiden.

Zur Sicherheit wurde eine zweite Injektion 1 mm weiter anterior bei gleicher Lateralität durchgeführt - die Injektionsmenge betrug dabei nur noch 0.1ml. Auf der Gegenseite wurde genauso verfahren.

Nach dem Eingriff wurde das Hinterhauptsloch mit einem Blutstillschwämmchen abgedeckt, die durchtrennte Nackenmuskulatur mit fortlaufender Naht und die äußere Haut mit Einzelknopfheften sorgfältig vernäht.

Um für die Dauer der postoperativen Überlebenszeit, welche durchschnittlich 72 Stunden betrug, eine ausreichende Analgesie sowie Ruhigstellung der Tiere gewährleisten zu können, bekamen diese 1-2 Stunden post operationem 0.2-0.3ml Vetranquil® (Sedativum mit antiemetischer und analgetischer Komponente) und 0.2-0.3ml Tomanol® (Antiphlogistikum, Antipyretikum, Analgetikum)/Tier appliziert, was ggfs. am darauffolgenden Tag wiederholt wurde.

2. Histologische Aufarbeitung

2.1. Perfusion

Nach einer Überlebenszeit von ca. 72 Stunden wurden die Versuchstiere zunächst mit Ketavet®/Rompun® narkotisiert. Anschließend wurde ihnen 1-2ml Ammoniumnitrit i.V. appliziert (zur Dilatation der Kapillaren im Gehirn).

Gleichzeitig bekamen sie eine Ampulle (≈0.5ml) Liquemin® (Natriumheparinat) i. V., um einer disseminierten intravasalen Gerinnung des Blutes vor und während der Perfusion vorzubeugen.

Danach wurden die Tiere mit einer Überdosis Nembutal® (Pentobarbital) eingeschläfert, und sofort - bevor der Herzstillstand eintrat - der Thorax eröffnet und der Perfusionsschlauch in den linken Ventrikel eingeführt.

Gleichzeitig mußte das rechte Atrium eröffnet werden, um dem rückströmenden Blut einen Abfluß zu ermöglichen.

Durch Abklemmen der Aorta descendens auf Höhe der Lendenwirbelsäule erzielte man eine Konzentration der Perfusionslösungen vor allem in den cranialen Körperpartien.

Während der gesamten Perfusionsdauer wurden die einzelnen Lösungen über eine Pumpe unter konstantem Druck und mit gleichmäßiger Geschwindigkeit in den Kreislauf des Versuchstieres geleitet.

Die einzelnen Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

- 1l physiologische Kochsalzlösung (0.9% NaCl) mit 0.1% Novocain® (Procainhydrochlorid; verhindert das Kollabieren der Kapillaren) bei 37°C

- 3l Fixierlösung I: 1% Paraformaldehyd, 1% Glutaraldehyd bei 4°C

- 1l Fixierlösung II: 2% Paraformaldehyd, 0.1% Glutaraldehyd bei 4°

Die Versuchstiere der ersten beiden Experimente wurden mit einer etwas anders zusammengesetzten Lösung perfundiert:

- 1l phys. NaCl (s. oben)

- 3l Fixierlösung: 1% Paraformaldehyd, 1.25% Glutaraldehyd bei 4°C

Die Perfusionsdauer betrug jeweils ca. eine Stunde. Nach der Perfusion ließ man das Gewebe weitere 30 min nachfixieren. Anschließend wurde die Schädeldecke aufpräpariert, das Gehirn entnommen, geblockt und über Nacht in 0.1m Phosphatpuffer, pH 7.4, bei 4° aufbewahrt.

2.2. Histochemischer MRP-Nachweis

Am darauffolgenden Tag wurden vom Mittelhirn 200µm dicke Vibratomschnitte, vom Nachhirn 100µm dicke Vibratom- bzw. 80µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

Gefrierschnitte haben den Vorteil einer schnelleren und einfacheren Herstellungstechnik, zeigen aber grundsätzlich eine sehr viel schlechtere Gewebserhaltung durch das Auftreten von Gefrierartefakten. Zudem muß beim Anfertigen von Gefrierschnitten das Gewebe zur Vermeidung von Gefrierartefakten und einer damit zusammenhängenden Zelldeformation über Nacht in einer Pufferlösung mit 25% Saccharoseanteil aufbewahrt werden (zumindest so lange, bis der Gewebeblock abgesunken ist).

Aus diesem Grunde eigneten sich Gefrierschnitte nur zur Herstellung von Hirnstammschnitten, da für die Darstellung der Injektionsstelle die weniger gute Gewebserhaltung durchaus ausreichend war.

Da das Gewebe aus dem Mittelhirnbereich noch für eine weitere, immunocytochemische Bearbeitung vorgesehen war und es hier auf eine gute Zellerhaltung in besonderem Maße ankam, wurden die 200µm dicken Frontalschnitte des Mittelhirns ausschließlich auf dem Vibratom (Oxford Inst. Inc.) angefertigt.

Die Schnitte (sowohl Vibratom als auch Gefrierschnitte) wurden in 0.1m Phosphatpuffer, pH 7.4, bei 4°C in einem speziellen, mit einzelnen Körbchen versehenen Behälter der Reihe nach aufgefangen und bis zur sich gleich anschließenden Inkubation in diesem Medium aufbewahrt.

Zur Sichtbarmachung der transportierten MRP wurden sowohl die Hirnstamm- als auch die Mittelhirnschnitte der Tetramethylbenzidin (TMB)-Nachweisreaktion (modifiziert nach Mesulam, 1978) unterzogen (genaue Rezepte s. Anhang).

Dabei war darauf zu achten, daß die Lösungen stets frisch, d.h. unmittelbar vor Gebrauch hergestellt wurden.

Nach zwei bis dreimaliger Waschung der Schnitte in eiskaltem aqua bidest folgte eine 20-minütige Präinkubation, welcher sich eine meist zweimal angesetzte Hauptinkubation von jeweils 30-40 min anschloß.

Prae- sowie Hauptinkubation fanden bei Raumtemperatur statt. Die Reaktionen ließ man dabei vorteilhafterweise auf einem Schüttler ablaufen, um sicher zu gehen, daß die Schnitte wirklich vollständig von den Inkubationsmedien durchdrungen wurden.

Während der Hauptinkubation wurde die Lösung zusätzlich mit Stickstoff durchspült. Auf diese Weise konnte eine übermäßige Kristallbildung und damit eine zu hohe Hintergrundfärbung vermieden werden. Das zur Hauptinkubation notwendige Substrat H_2O_2 wurde nicht direkt zugegeben, sondern langsam durch das Enzym Glucose-Oxidase (GOD) aus β -D-Glucose freigesetzt (Itoh et al., 1979).

Somit erzielte man eine kontrolliertere und gleichmäßiger ablaufende Reaktion, als wenn man das H_2O_2 direkt zugeben würde.

Nach der eigentlichen Nachweisreaktion wurde das Reaktionsprodukt in einer 5%igen Ammoniumheptamolybdat-Lösung für 10 -20min bei 4°C stabilisiert (Fujii und Kusama, 1984; Olucha et al., 1985).

Die Hirnstammschnitte wurden nach der Stabilisierungsreaktion kurz in kaltem aqua bidest gespült, auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, nach dem Trocknen entwässert und entweder ungefärbt eingedeckelt oder mit Neutralrot gegengefärbt und dann mit Depex (Einschlußmedium) eingedeckelt.

Wegen der Instabilität des TMB-Reaktionsproduktes empfiehlt sich die weitere Aufbewahrung von TMB-reagiertem Material grundsätzlich im Dunkeln und bei Temperaturen von

unter 10°C, um ein vorzeitiges Ausbleichen zu verhindern.

Diese Instabilität erweist sich auch als problematischer Faktor während der sich anschließenden immuncytochemischen Behandlung der Mittelhirnareale.

Da die einzelnen immuncytochemischen Arbeitsgänge nur in neutralen Puffern funktionieren und die zahlreichen Pufferspülungen das TMB-Reaktionsprodukt sehr schnell wieder auswaschen würden, mußte zwischen TMB-Nachweis und Immuncytochemie ein weiterer Stabilisierungsschritt eingebaut werden, um die angestrebte Doppelmarkierungsmethode zu ermöglichen.

So wurden sämtliche Schnitte, welche für eine zusätzliche immuncytochemische Behandlung vorgesehen waren, einer von Rye et al. (1984) empfohlenen Nachreaktion mit DAB/CoCl₂ (Adams, 1977) unterzogen.

2.3. Harzstufen und Einbettung (Post-Embedding)

Nach den Arbeitsgängen des MRP-Nachweises wurden die für die Immuncytochemie vorgesehenen Schnitte im Anschluß an die DAB/CoCl₂-Nachreaktion in 0.01m Phosphatpuffer mit NaCl (PBS) überführt und mehrmals gründlich gespült.

Danach wurden ca. stecknadelkopfgroße Areale des NOT- bzw. Colliculus superior - Gebietes aus den 200µm dicken Vibratomschnitten unter Zuhilfenahme einer feinen anatomischen Pinzette und einer geraden chirurgischen Augenschere herausgeschnitten.

Dabei war darauf zu achten, daß nur solche Areale herausgetrennt wurden, welche auch genügend retrograd markierte Zellen enthielten. Um dies überprüfen zu können, wurde diese ganze Präparationsarbeit unter einem Binokular durchgeführt.

Nun wurden die herauspräparierten NOT- bzw. Colliculus-Blöckchen nochmals in PBS gespült und entweder sofort oder

am darauffolgenden Tag über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert.

Nach der Entwässerung schloß sich unmittelbar die Kunstharzeinbettung an:

Aus dem Alkohol wurden die Gewebestückchen in ein Zwischenmedium aus Harzgemisch und Aceton überführt, wobei der Harzanteil von 1:3 ($\approx$ Harzgemisch:Aceton) über 1:2 bis 3:1 kontinuierlich erhöht werden mußte, bevor man die Blöckchen ins unverdünnte Harzgemisch übertragen konnte.

Als Harzeinbettungsmedium verwendete ich 'Epon' (Kunstharzgemisch).

Dem reinen Harzgemisch mußte - kurz bevor die Blöckchen eingelegt wurden - noch 1.5% Beschleunigermedium zugemischt werden, da ansonsten eine gute Durchdringung des Gewebes sowie das Zustandekommen einer schneidegeeigneten Konsistenz nicht gewährleistet war.

Nun beließ man das Harzgemisch mit den Gewebeblöckchen über Nacht bei 20°C in einem Exsikkator.

Am darauffolgenden Tag wurde ein frisches Harzgemisch angesetzt, 1.5% Beschleunigermedium zugegeben und die einzelnen Gewebestückchen mit einer feinen Pinzette oder einem Glasstab in geeignete Einbettungsformen überführt und möglichst so plaziert, daß sie durch das Einbettungsmedium in horizontaler Lage fixiert wurden.

Gelatinekapseln waren zur Einbettung weniger geeignet, da durch ihr konvex geformtes Ende eine flache Lagerung der Blöckchen sehr schwer eingehalten werden konnte.

Die in Kunstharz fertig eingebetteten Blöckchen ließ man im Brutschrank bei 60°C polymerisieren.

Zur Vorbereitung für den sich nun anschließenden Schneidevorgang wurden die im jetzt polymerisierten Kunstharz eingeschlossenen Blöckchen grob zugetrimmt und auf das zurechtgefeilte Ende einer Gelatinekapsel so aufgeklebt, daß die endgültige Schnittebene horizontal lag.

Somit konnte eine relativ große Fläche des Gewebeblöckchens angeschnitten werden.

Das Anfertigen der Semidünnschnitte erfolgte an einem Ultramikrotom (Reichert).

Von den einzelnen NOT- bzw. Colliculus-Blöckchen wurden 1mm dicke Serienschnitte angefertigt und diese auf speziell vorbereitete, mit Teflon beschichtete Objektträger überführt. Die Reihenfolge der einzelnen Schnitte konnte später leicht nachvollzogen werden, da die mit Teflon beschichteten Objektträger 10 kleine, runde, teflonfreie Aussparungen - sogenannte 'Töpfchen' - enthielten.

In jedes dieser Töpfchen wurden maximal drei Schnitte gelegt, wobei die Reihenfolge der einzelnen 'Töpfchen' festgelegt war.

Die teflonfreien Aussparungen auf den Objektträgern erreicht man durch Aufbringen einer gewünschten Anzahl von Glyzerin-Tropfen auf den noch unbehandelten Objektträger, anschließender Teflon-Besprühung und Abwaschen der Glyzerin-Tropfen unter fließendem Wasser. An den Stellen, an denen sich vorher die Glyzerintropfen befanden, hat man jetzt teflonfreie Aussparungen zur serienmäßigen Platzierung der Semidünnschnitte.

Unmittelbar nach dem eigentlichen Schneidevorgang mußten die Semidünnschnitte für ca. 10min auf eine Heizplatte (90°C) gelegt werden. Dadurch erzielte man ein regelrechtes 'Aufbraten' der Schnitte auf die Objektträger und konnte so ein eventuelles Abschwimmen während der sich anschließenden Immunhistochemie vermeiden.

Um überhaupt eine Bindung des Antikörpers an das Antigen im Gewebe zu ermöglichen, mußten die Semidünnschnitte vor der Immuncytochemie wieder entharzt werden. Als Entharzungsmedium diente gesättigtes Natrium-Methylat. Problematisch bei diesem Arbeitsgang war die Dauer der Entharzungszeit und das Alter des Entharzungsmediums.

Frisches Natrium-Methylat ist sehr aggressiv und bewirkt eine rasche Gewebeerstörung, während älteres

Methylat zwar gewebeschonender ist, die Schnitte aber dadurch auch meist unvollkommen entharzt werden, sodaß eine spätere Antikörperbindung nicht mehr möglich ist.

So mußten vor jeder Immunreaktion mehrere Modifikationen in Entharzungszeit und in der Verwendung unterschiedlich alter Methyllate ausgetestet werden, um diese immer wieder variierenden Parameter bei jedem einzelnen Entharzungsvorgang optimal zu gestalten.

Unmittelbar im Anschluß an die Entharzung folgten die immuncytochemischen Arbeitsgänge.

2.4. GABA-Immuncytochemie

Die immuncytochemischen Schritte wurden direkt an den entharzten Semidünnschnitten auf dem Objektträger durchgeführt. Verfahren wurde nach der von Sternberger et al. (1979) beschriebenen PAP-Methode.

Nach der Entharzung wurden die mit den Semidünnschnitten besetzten Objektträger mehrmals in PBS gespült und anschließend für 15min in eine 10% Methanol- und 3% H_2O_2 -haltige PBS-Lösung verbracht. Dies diente der Blockierung endogener Peroxidasen.

Nach dreimaliger Spülung in PBS kamen die Objektträger für 30min in eine 10% Normalschweineserum enthaltende PBS-Lösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.

Die bis hierher angegebenen Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Dann folgte unmittelbar, ohne Pufferspülung die Beschichtung der Objektträger mit der ersten Antikörperverschüttung.

Sämtliche Antikörperverschüttungen wurden immer in einer 0.05% Natriumazid und 5% Normalschweineserum enthaltenden PBS-Lösung angesetzt. Das Natriumazid verhindert durch seinen fungiziden und bakterioziden Effekt einen zu

schnellen Verderb des Phosphatpuffers.

Alle Antikörperverdünnungen wurden grundsätzlich kurz vor Gebrauch angesetzt. Da die Antikörperseren, insbesondere der GABA-Antikörper sehr teuer sind und ein übermäßiger Verbrauch möglichst vermieden werden sollte, wurde nicht die ganze Oberfläche eines Objektträgers mit der Antikörperlösung beschichtet, sondern nur die mit den Schnitten besetzten 'Töpfchen'.

Dies gelang am besten durch Auftröpfeln der Lösungen mittels einer Pipette.

Die mit dem Anti-GABA-Serum beschichteten Objektträger (Anti-GABA-Serum vom Kaninchen, die Verdünnungsstufen variierten von 1:1000 bis 1:4000) wurden in eine feuchte Kammer verbracht und im Kühlschrank für 36 h bei 4°C aufbewahrt.

Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper sowie mit dem PAP-Komplex fand wieder bei Raumtemperatur statt.

Zwischen den einzelnen Inkubationsstufen lagen jeweils drei Spülungen in PBS.

Als zweites Inkubationsmedium diente ein Antiserum gegen Kaninchen-IgG vom Schwein, 1:100 verdünnt. Die Inkubationsdauer betrug zwei Stunden.

In der dritten und letzten Inkubationsstufe wurde der PAP-Komplex eingeführt (PAP vom Kaninchen, 1:50 verdünnt). Die Inkubationsdauer betrug wiederum zwei Stunden.

Auf die anschließende PBS-Spülung folgte ein Pufferwechsel zu 0.05m Tris-Puffer mit NaCl (TBS).

Nach zweimaliger Waschung wurden die Objektträger zum Nachweis der Peroxidase in eine frisch angesetzte 0.05%ige DAB-Lösung (Sigma) in 0.05m TBS überführt. Darin wurden sie 5min lang vorinkubiert. Durch Zugabe von 0.01% H_2O_2 erfolgte die Hauptinkubation für ca. 10min.

Anstelle der H_2O_2 -Zugabe kann man auch die Intensivierungsreaktion mit Glucose und Glucose-Oxidase (Itoh et al., 1979) verwenden, welche meiner Erfahrung nach hier jedoch keine wesentlichen Verbesserungen bringt. Zudem verlängert sich die Inkubationsdauer hierbei auf ca. 30 min.

Als günstiger für die Intensität der DAB-Reaktion erwies sich eher eine leichte Erwärmung des Inkubationsmediums auf ca. 35°C.

Durch mehrere Waschungen in TBS wurde die Peroxidase-Reaktion abgebrochen.

Im Anschluß daran wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Depex eingedeckelt.

Einige Schnitte wurden versuchsweise mit Methylenblau gegengefärbt. Dies erwies sich jedoch als ungünstig, da dadurch die oft sehr zarten und blassen GABA-immunreaktiven Strukturen überfärbt wurden und kaum mehr zu erkennen waren.

Die als Kontrollen mitgeführten Schnitte wurden anstatt mit GABA-Antiserum als erstem Antikörper mit Normalkaninchenserum behandelt, die restlichen Schritte wurden nicht modifiziert.

2.5. Auswertung

Die gesamte Auswertung wurde am Lichtmikroskop durchgeführt.

2.5.1. Injektionsstellen

Zur Dokumentation der Injektionsstellen wurden die Hirnstammschnitte auf Höhe der Oliva inferior in konstanten Abständen an einem Zeichenmikroskop gezeichnet.

In die Umrißzeichnungen wurden das Diffusionsareal der MRP sowie die Stichkanäle der Hamilton-HI-Spritze eingetragen.

2.5.2. Retrograd markierte Neurone

Zur Demonstration der anatomischen Lage des NOT- bzw. Colliculus-Bereiches wurden die Mittelhirnschnitte auf entsprechender Höhe an einem Mikroskop mit Zeichenspiegel als Übersichtszeichnungen gezeichnet.

Zur besseren Orientierung sind zusätzlich einige wichtige mesencephale Kerngebiete eingetragen (nach Berman, 1968).

Die retrograd markierten NOT- bzw. Colliculusneurone werden in diesen Übersichtsaufnahmen durch schwarze Punkte repräsentiert.

Hellfeldaufnahmen an einem Photomikroskop (Zeiss) demonstrieren diese mit MRP markierten Zellen an 200µm dicken Vibratomschnitten vor der Harzeinbettung.

Dunkelfeldaufnahmen dokumentieren die gleichen Neurone an Semidünnschnitten vor der Entharzung und vor der Immunhistochemie.

2.5.3. GABA-Immuncytochemie

Zur quantitativen Analyse der Terminalendichte um die verschiedenen Zellpopulationen des NOT- bzw. Colliculus-Gebietes wurden die Umrisse der retrograd markierten Neurone sowie die unmarkierter Zellen des NOT-Gebietes bei höherer Vergrößerung gezeichnet.

Zusätzlich wurden die in der Umgebung dieser Zellen lokalisierten gabaergen Terminalen vollständig eingetragen.

Auf diese Weise konnten die Querschnitte durch die einzelnen Zellen mitsamt dem umliegenden Terminalenverteilungsmuster komplett rekonstruiert werden.

Anschließend wurden auf einem transparenten Zeichpapier der jeweilige Umriß des Zellsomas bzw. der Dendriten

sowie die Abstände von 5- und 10 μ m um die Somata bzw. Dendriten eingezeichnet.

Nun konnte die exakte Anzahl der Terminalen um eine Zelle bzw. um ihre Dendriten durch Auszählen der GABA-positiven 'Punkte' innerhalb der oben beschriebenen Grenzlinien bestimmt werden. Ausgezählt wurde folgendermaßen:

- T_d: Anzahl der Terminalen, welche lichtoptisch direkt das Soma bzw. den Dendriten kontaktieren ($\approx$ 0 μ m Abstand)
- T_r: Terminalendichte der Fläche r ($\approx$ 0-5 μ m Abstand vom Soma bzw. Dendriten des zu analysierenden Neurons)
- T_a: Terminalendichte der Fläche a ($\approx$ 5-10 μ m Abstand vom Soma bzw. Dendriten des zu analysierenden Neurons)

Die eigentliche Auswertung, d.h. die Normierung der Flächen auf die Anzahl der Terminalen/100 μ m² sowie die Bestimmung des direkten gabaergen Besatzes auf einem definierten Abschnitt der Zellmembran erfolgte an einem Computer (ATARI 1040 ST).

Ausgewertet wurden insgesamt zwölf retrograd markierte NOT-Zellen und deren proximale Dendriten, vier tiefe Colliculus-Neurone sowie vier nicht retrograd markierte Zellen des NOT-Gebietes.

Für die statistische Analyse (Rangtest nach Wilcoxon für zwei Stichproben, einseitig) wurden pro Zelle jeweils sechs Querschnitte herangezogen, welche von den einzelnen Rekonstruktionsserien nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden. So war es möglich, auf einem Signifikanzniveau von $p=0.05$ zu arbeiten.

Der photographischen Illustration dienen Hellfeldaufnahmen der verschiedenen Neuronenklassen vor und nach der GABA-Immunhistochemie, welche an einem Photomikroskop (Zeiss) bei hoher Vergrößerung aufgenommen wurden.

C Ergebnisse

1. GABA-immunreaktive Zellelemente

Die untersuchten Areale des Mittelhirns der Katze weisen durchweg einen hohen Gehalt an GABA-positiven Zellstrukturen auf.

Durch die immuncytochemische Nachweismethode lassen sich GABA-immunreaktive Strukturen selektiv darstellen.

Im Laufe der Experimente wurden zwei verschiedene Antikörperchargen verwendet, wobei die erste Charge bei Verdünnungen von 1:3000 bis 1:4000 eine spezifische Markierung GABA-positiver Zellstrukturen ermöglichte.

Die zweite Antikörpercharge lieferte erst bei relativ niederen Verdünnungsstufen von 1:1000 und darunter vergleichbare, auswertbare Ergebnisse.

Die als Kontrollen mitgeführten Schnitte, bei welchen der GABA-Antikörper durch Normalkaninchenserum substituiert war, zeigten grundsätzlich keine Anfärbung von Zellelementen, allenfalls eine unspezifische blaßbraune Hintergrundfärbung.

1.1. GABA-immunreaktive Neurone

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Ratte: Mugnaini und Oertel, 1985; Ottersen, 1984; Giolli et al., 1985; Horn und Hoffmann, 1987; Katze: Weber und Chen, 1984; Horn und Hoffmann, 1987) traf auch ich in meinen Untersuchungen auf eine relativ hohe Anzahl GABA-immunreaktiver Neurone - sowohl im NOT-Bereich als auch in den verschiedenen Schichten des Colliculus superior.

Diese GABA-positiven Neurone heben sich von der Umgebung durch ihre kräftige, homogene Braunfärbung deutlich ab.

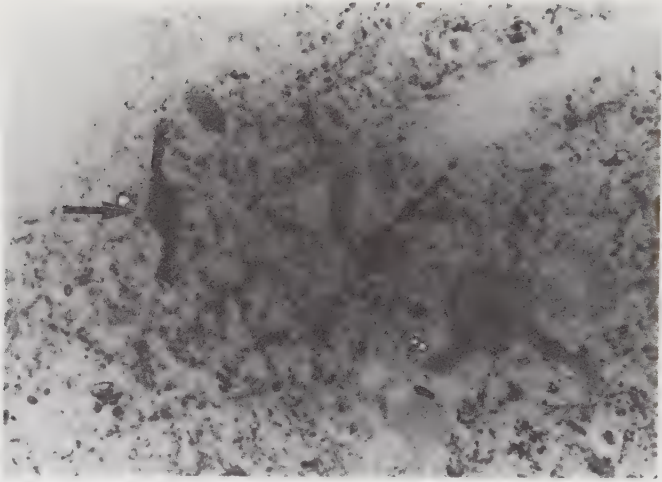


Abb. 4

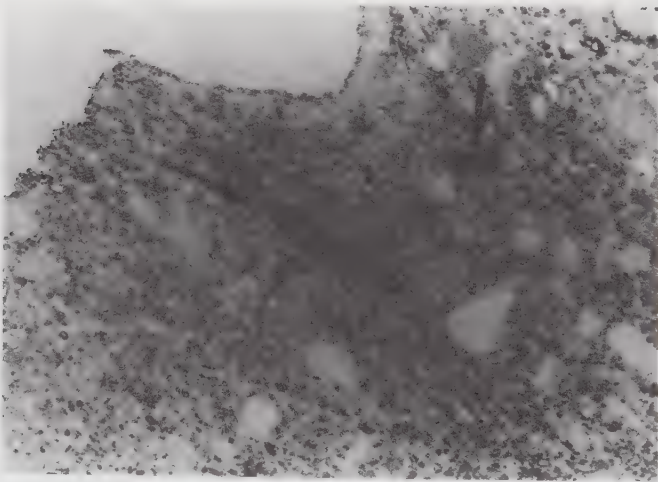


Abb. 5

25µm

Abb. 4 und 5 zeigen GABA-immunreaktive Neurone (Pfeil) im NOT der Katze, die nicht retrograd markiert sind.

Auf eine quantitative Analyse des prozentualen Anteils dieser Neuronenklasse an der Gesamtneuronenpopulation des NOT habe ich in meinen Untersuchungen verzichtet, da sich mein Material allein schon auf Grund der geringen Größe und Dicke der Schnitte nicht für derartige Untersuchungen eignete.

Eine Berechnung der Somaflächen von NOT-Neuronen (Horn und Hoffmann, 1987) ergab eine durchschnittliche Somafläche für Projektionsneurone im NOT der Katze von $534\mu\text{m}^2$ und für GABA-immunreaktive Neurone von $130\mu\text{m}^2$.

Rein subjektiv entsteht auch an meinen Bildern der Eindruck, daß diese GABA-positiven Neurone etwas kleiner sind als z.B. die retrograd markierten Projektionsneurone.

Von einer nochmaligen Überprüfung dieser Größenangaben habe ich in meinen Untersuchungen ebenfalls abgesehen, da die für die 'Post-Embedding-Methode' notwendige Bearbeitung des Gewebes, insbesondere die verschiedenen Harzeinbettungs- und Entharzungsschritte eine enorme Gewebeschrumpfung zur Folge hatten und somit eine objektive Bestimmung der Somaflächen von einzelnen Zelltypen unmöglich wurde.

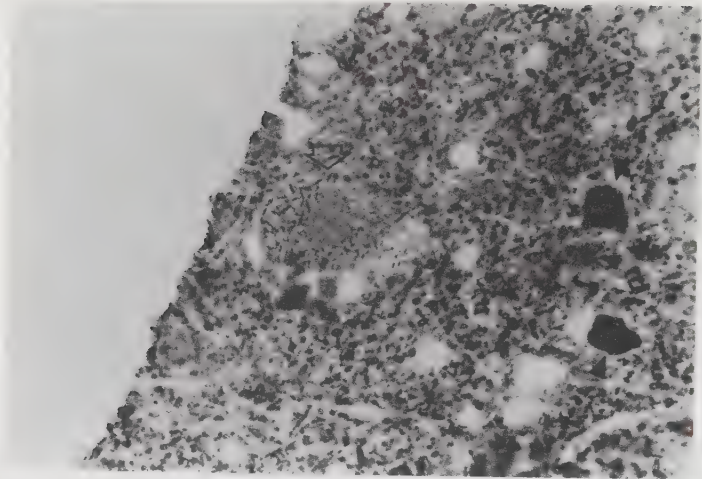


Abb.6

25μm

Abb.6 zeigt kleine GABA-immunreaktive Neurone (►) im Vergleich zu einem retrograd markierten Projektionsneuron (◄) im NOT.

Keines der retrograd markierten Neurone war gleichzeitig auch GABA-immunreaktiv.

1.2. GABA-immunreaktive Terminalen

Die analysierten Kerngebiete des Mittelhirns sind durch den Gehalt einer relativ hohen Dichte GABA-positiver 'Punkte' charakterisiert, welche das NOT- bzw. Colliculus-Areal in diffuser Verteilung durchsetzen.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ließen sich diese 'Punkte' in den meisten Fällen als Axonterminalen identifizieren (Ribak, 1979).

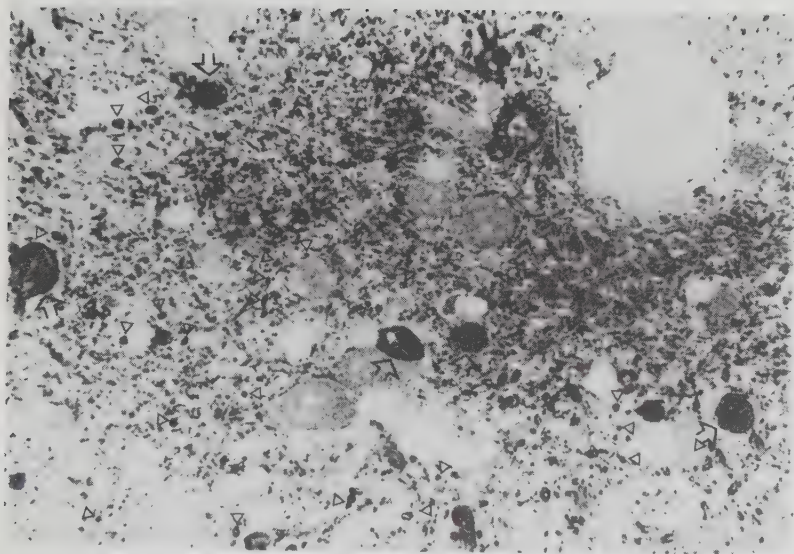


Abb. 7

25 μm

Abb. 7: GABA-immunreaktive Strukturen im NOT. Auffallend ist die hohe Dichte GABA-positiver Terminalen (➤), welche das ganze Kerngebiet durchsetzen. Kleine, GABA-immunreaktive Zellen (▷) heben sich durch ihre kräftige Markierung gut vom Hintergrund ab.

An dickeren Schnitten wurde festgestellt, daß die maximale Eindringtiefe des Antikörpers ca. 8µm beträgt (Horn und Hoffmann, 1987).

Bei den 1µm dünnen Schnitten meiner Untersuchungen ist davon auszugehen, daß sämtliche GABA-immunreaktive Zellelemente durch den eingedrungenen Antikörper erfaßt und markiert werden.

2. Doppelmarkierung

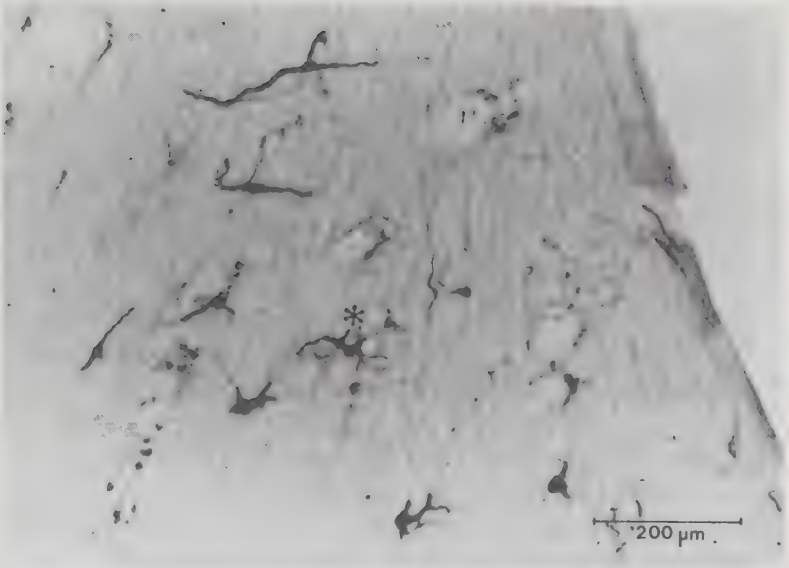
Um das quantitative Verteilungsmuster der Terminalendichte um die NOT- bzw. Colliculus-Neurone überhaupt erfassen zu können, mußte die gleichzeitige Darstellung der zu analysierenden Neurone und der GABA-positiven Zellelemente in einem Schnitt gelingen.

Eine stabile, die Harzeinbettung und die Immuncytochemie überstehende Markierung der NOT-Projektionsneurone wurde durch die retrograde Füllung dieser Neurone mit MRP von der Oliva inferior aus und anschließender Nachweisreaktion mit TMB erzielt.

Dabei mußte der TMB-Nachweis unbedingt mit der von Rye et al. (1984) vorgeschlagenen DAB/CoCl₂-Stabilisierungsreaktion kombiniert werden, um ein Ausbleichen des TMB-Reaktionsproduktes während den sich anschließenden Arbeitsgängen der Harzeinbettung, des Schneidens und der Immuncytochemie zu verhindern.

Als Ergebnis dieser modifizierten TMB-Reaktion erhielt man dann mit schwarzen Granula mehr oder weniger stark gefüllte Neurone, welche sich gut von den homogen braun gefärbten GABA-immunreaktiven Zellstrukturen abgrenzen lassen.

8a



8b

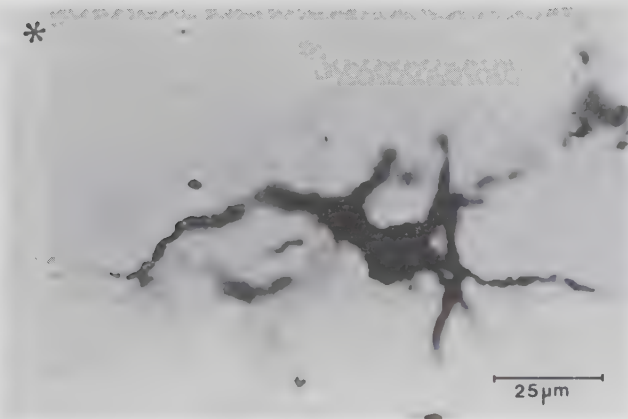
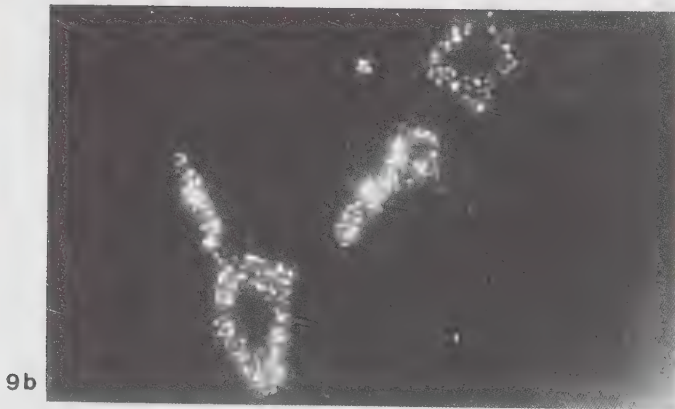


Abb. 8a.: Hellfeldaufnahme retrograd markierter NOT-Neurone in Vibratomschnitten vor der Harzeinbettung.

b.: Ausschnittvergrößerung von (*).



25µm

Abb. 9a, b: Dunkelfeldaufnahmen retrograd markierter NOT-Neurone in Semidünnschnitten vor der Entharzung und vor der Immunhistochemie. TMB-Kristalle erscheinen bei Dunkelfeldbeleuchtung weiß, der Hintergrund dagegen fast schwarz.

2.1. Referenzstrukturen

Die großen Neurone des Stratum griseum intermediale (SGI) des Colliculus superior erhalten eine gabaerge Projektion aus der Substantia nigra (Chevalier et al., 1981).

Durch eine immunocytochemische Studie (Lu et al., 1985) konnte unter Verwendung eines GAD-Antikörpers ein massiver Besatz dieser Zellen mit GAD-positiven Terminalen nachgewiesen werden. Insbesondere die Somata und proximalen Dendriten dieser Neurone werden von den GAD-positiven Terminalen in großer Anzahl kontaktiert.

Das Diffusionsareal der MRP im Bereich der Oliva inferior erfaßte unter anderem auch die efferenten Bahnen dieser tiefen Colliculusneurone. Damit war eine gleichzeitige retrograde Markierung sowohl von NOT-Neuronen als auch von Colliculusneuronen von dieser Injektionsstelle aus möglich.

Die TMB-Nachweisreaktion zur Darstellung der Colliculusneurone erfolgte analog zu dem bereits für die NOT-Neurone beschriebenen Verfahren.

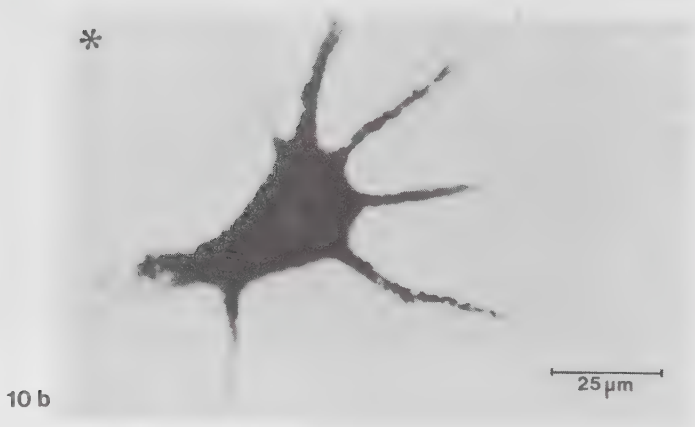
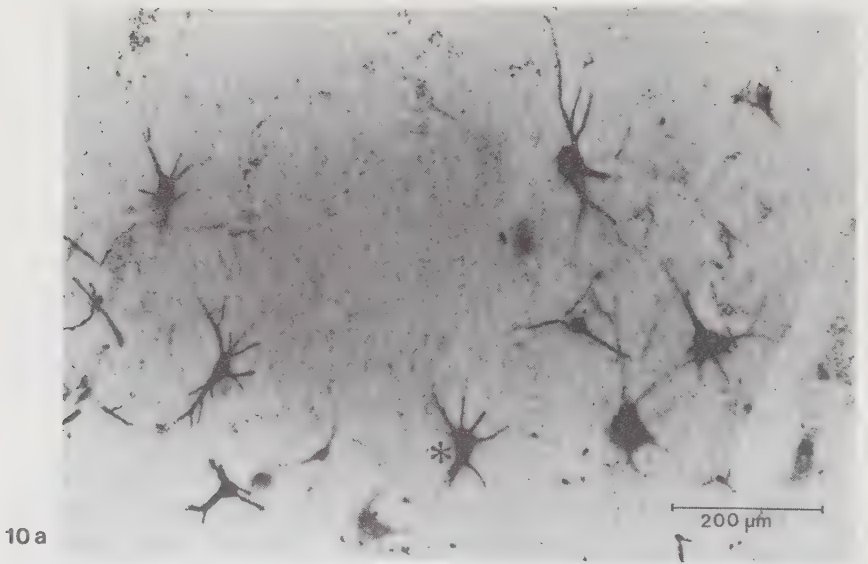


Abb. 10a: Hellfeldaufnahme retrograd markierter Colliculusneurone in Vibratomschnitten vor der Harzeinbettung.

b: Ausschnittvergrößerung von (*).

Der starke Besatz der Colliculusneurone mit GAD-positiven Terminalen liefert eine gut untersuchte Referenzstruktur, anhand derer nun überprüft werden kann, ob - und wenn ja - welche Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation und der quantitativen Verteilung GABA-immunreaktiver Terminalen auftreten, wenn man diese Parameter mit entsprechenden Parametern praetectaler Neurone vergleicht.

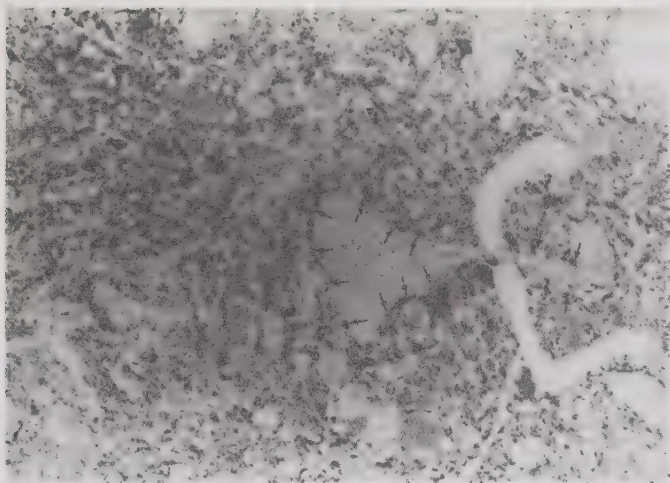


Abb. 11

25 µm

Abb. 11: Mikrophotographie eines retrograd markierten Neurons (schwarze Granula im Soma) im SGI des Colliculus superior. Auffallend ist der starke Besatz des Somas und der proximalen Dendriten mit GABA-positiven Terminalen (→), welche die Zellkonturen nachzeichnen.

2.2. Injektionsstellen und retrograd markierte Neurone

Durch eine MRP-Injektion in die dorsale Kappe der Oliva inferior wurden sowohl richtungsspezifische NOT-Neurone als auch tiefe Colliculusneurone retrograd markiert.

Rekonstruktionen der Schnittserien auf Höhe der Oliva inferior veranschaulichen den Injektionsort der Hamilton-HI-Spritze sowie das Diffusionsareal der injizierten MRP.

Querschnittszeichnungen durch das Mittelhirn auf Höhe des NOT bzw. des Colliculus superior dienen der Darstellung von retrograd markierten Zellen in den entsprechenden Kerngebieten.

Die Eintragung weiterer Areale des Mittelhirns erfolgte nach Berman (1968).

Auf der nächsten Seite:

Abb. 12: Rekonstruktion einer Schnittserie (Exp. I) durch den Hirnstamm auf Höhe der Oliva inferior. Die Stichkanäle sind schwarz eingezeichnet. In Schnitt 1 (rostral) ist das Diffusionsareal der MRP schraffiert dargestellt. Die Dichte der Schraffur entspricht der Konzentration der MRP. Das Diffusionsareal ist in den Schnitten 2-15 zur besseren Übersicht nur umrandet. Die Umrisse der dorsalen Kappe der Oliva inferior sind durch gepunktete Linien angedeutet.

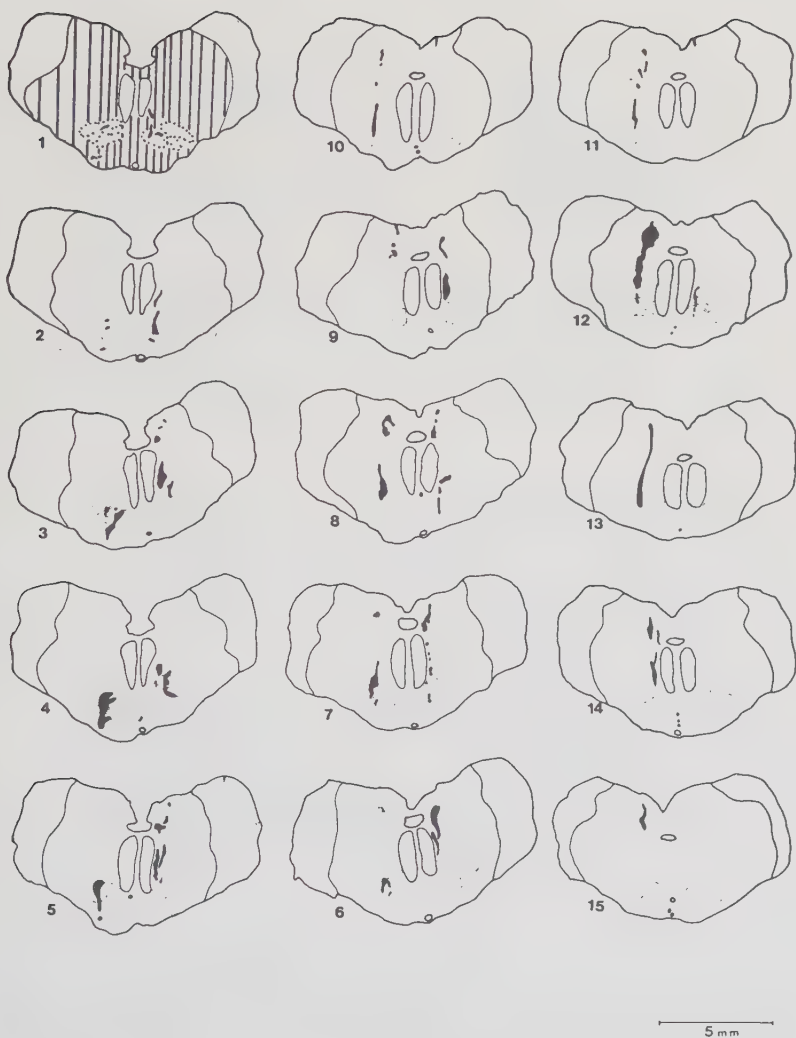


Abb. 12

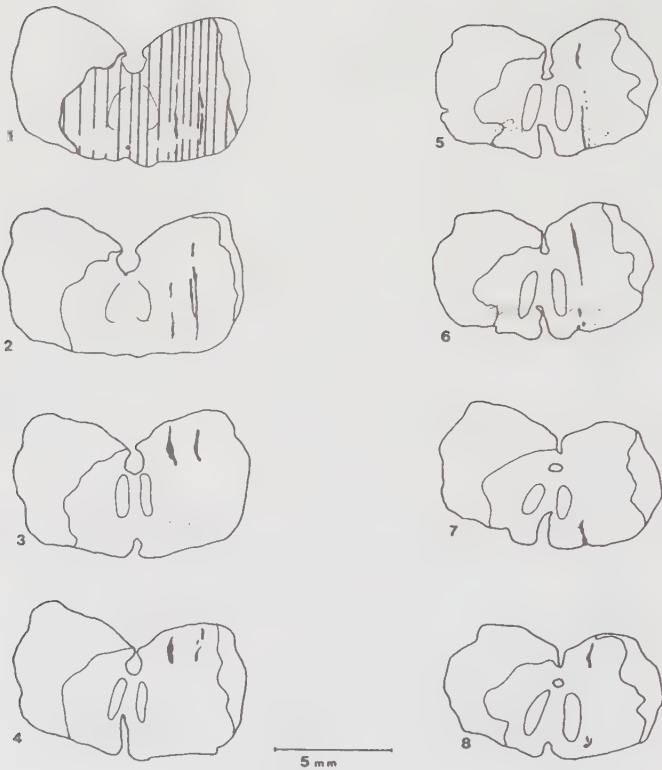


Abb. 13: Injektionsstelle der Oliva inferior (Exp III). Die Injektion erfolgte einseitig. Das Diffusionsareal der MRP (in Schnitt 1 schraffiert) erfaßt auch die kontralaterale Seite. Die Schnittdicke beträgt 80 μ m, jeder zweite Schnitt ist gezeichnet. Die Schnitte sind von rostral nach caudal angeordnet.

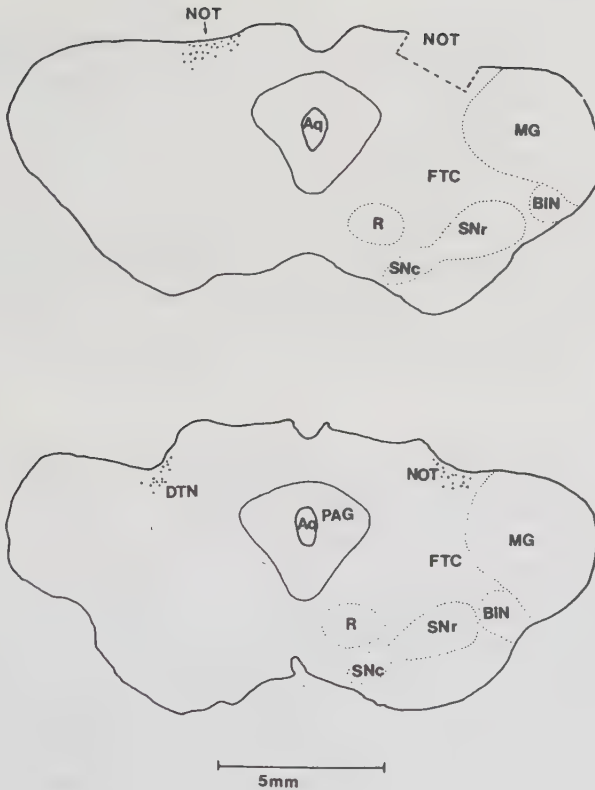


Abb. 14: Frontalschnitte durch das Mittelhirn auf Höhe des NOT. Retrograd markierte Neurone sind als Punkte dargestellt. Die gestrichelte Linie umrandet das für die Immunhistochemie herausgetrennte Areal (Abkürzungen der Kerngebiete s. Verzeichnis).

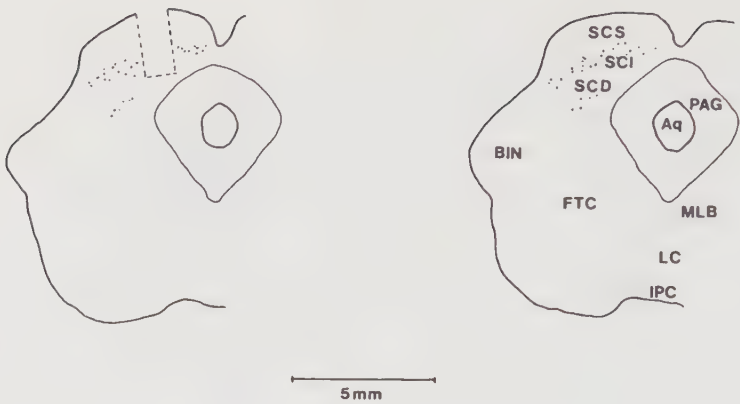


Abb. 15: Frontalschnitte durch das Mittelhirn im Bereich des Colliculus superior (Erklärung s. Abb. 14).

2.2.1. NOT-Projektionsneurone und GABA-Immuncytochemie

Untersucht man die räumliche Beziehung GABA-positiver Strukturen zu den retrograd markierten NOT-Neuronen, so stellt man fest, daß in der Nachbarschaft dieser Neurone zwar GABA-positive 'Punkte' vorhanden sind, diese jedoch deren Somata nicht in dem Ausmaß umsäumen, wie das z.B. bei den tiefen Colliculusneuronen der Fall ist. Im Gegenteil, die GABA-positiven Terminalen scheinen die Somata der NOT-Neurone regelrecht zu 'meiden', nur ganz vereinzelt berühren sie deren Zellmembran direkt, d.h. ohne einen lichtmikroskopisch erkennbaren Zwischenraum einzuhalten.

Bei keinem der von mir analysierten Schnitte durch retrograd markierte NOT-Zellen konnte ein den tiefen Colliculuszellen vergleichbares Bild gefunden werden.

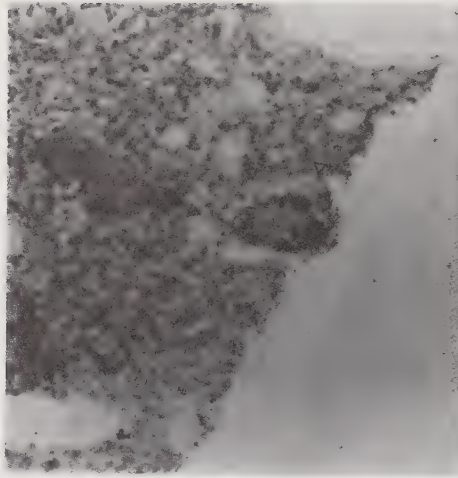
Einige wenige Terminalen scheinen zwar unmittelbar an

die Somata und proximalen Dendriten anzugrenzen, die überwiegende Mehrzahl von ihnen meidet jedoch den direkten Kontakt.

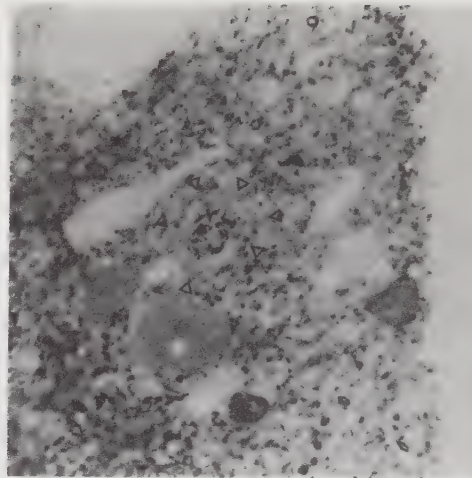
So läßt sich lichtoptisch eine nahezu terminalenfreie Zone erkennen, welche das Soma der markierten NOT-Zelle in einem Abstand von 5µm umrandet.

Durch die geringe Terminalendichte erscheint diese Zone als 'heller Hof' im lichtmikroskopischen Bild.

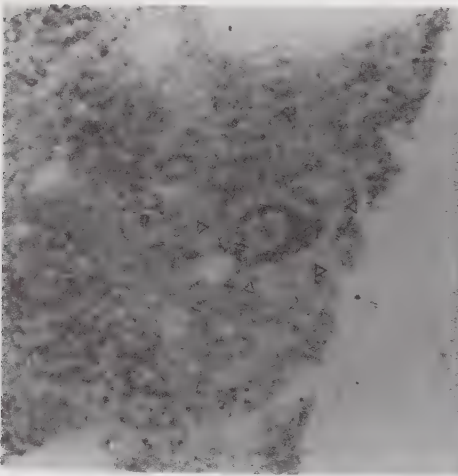
Jenseits dieser 'hellen Zone' (Abstand > 5µm vom Soma) steigt die Terminalendichte wieder kontinuierlich an und durch die Braunfärbung der Terminalen erscheint dort nun auch das gesamte histologische Bild wieder dunkler.



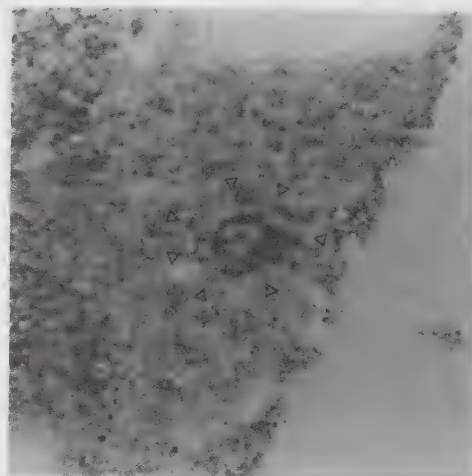
16a



16d



16b



16c

25µm

Abb 16a-d: Serienschnitte eines retrograd markierten NOT-Neurons (*), umgeben von einer terminalenarmen Zone ('heller Hof' >).

2.2.2. Nicht markierte NOT-Neurone und GABA-Immuncytochemie

Neben den eben besprochenen Projektionsneuronen existieren im NOT auch Neurone, welche in ihrer Somagröße den NOT-Projektionsneuronen ähneln, von der Oliva inferior aus jedoch nicht retrograd markiert werden.

Die Somata und proximalen Dendriten dieser Neurone zeichnen sich im Gegensatz zu den NOT-Projektionsneuronen durch einen starken Besatz mit GABA-positiven 'Punkten' aus.

Sie weisen in dieser Eigenschaft also große Ähnlichkeit mit den tiefen Colliculusneuronen auf. In gleicher Weise werden diese Neurone in ihren Konturen von den GABA-positiven Terminalen regelrecht 'eingerahmt'.

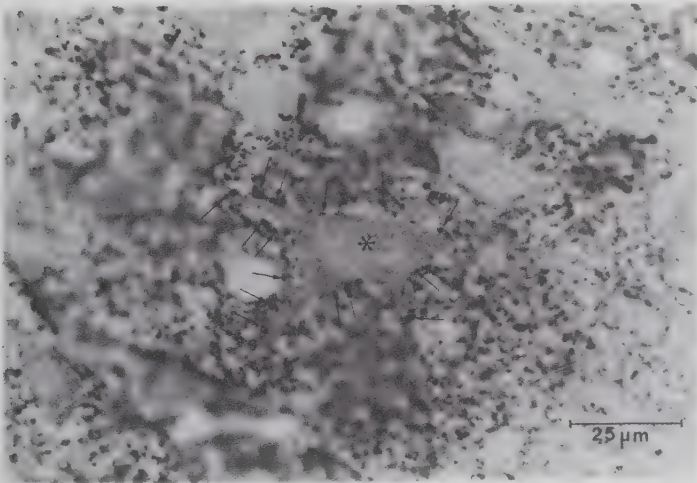
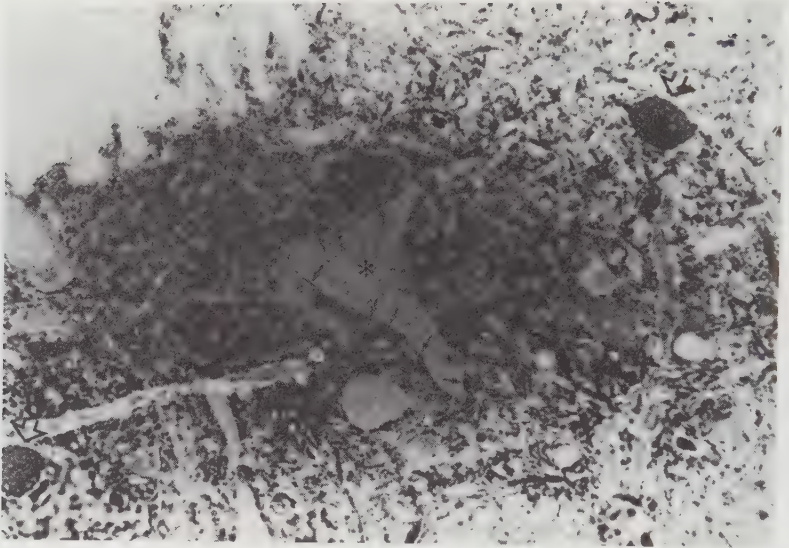


Abb. 17

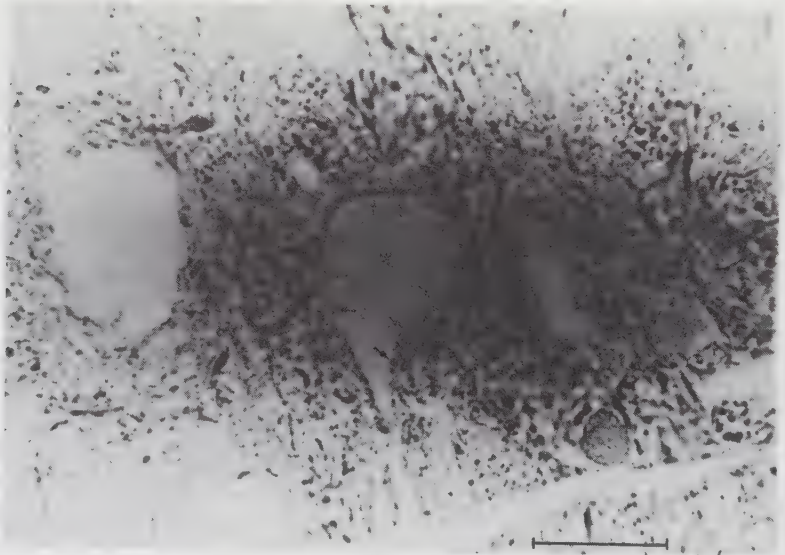
25 µm

Abb. 17: Nicht retrograd markiertes, GABA-negatives NOT-Neuron (*) mit starkem Besatz GABA-positiver Terminalen (→).

18 a



18 b



25µm

Abb. 18a, b: Nicht retrograd markierte, GABA-negative NOT-Neurone (*) mit dichtem gabaergen Besatz (→). Zum Größenvergleich: 2 kleine, GABA-positive Neurone (⇨).

3. Quantitative Analyse der Terminalendichte

Zur quantitativen Auswertung der Terminalendichte an bzw. um die einzelnen Zelltypen des NOT und Colliculus superior wurden die 14µm dicken Serienschritte von insgesamt

- 12 NOT-Projektionsneuronen bzw. deren proximale Dendriten
- 4 nicht retrograd markierten Neuronen des NOT-Areals
- 4 Zellen des SGI des Colliculus superior

herangezogen.

Ausgewertet wurden pro Zelle jeweils 6 Schnitte. So ließ sich auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von 95% arbeiten (Rangtest nach Wilcoxon; nähere Erläuterungen s. Material und Methoden).

3.1. Quantitative Terminalenverteilung in unmittelbarer Nachbarschaft der Neurone des NOT bzw. Colliculus superior

3.1.1. Die Analyse der NOT-Projektionsneurone

Diese Analyse wurde für deren Somata und Dendriten - soweit möglich - getrennt durchgeführt.

Untersucht wurde die Terminalendichte der Fläche α (Abstand 0-5µm von der Zellmembran), welche der Zone des 'hellen Hofes' entspricht, im Vergleich zur Terminalendichte der Fläche β (Abstand 5-10µm von der Zellmembran).

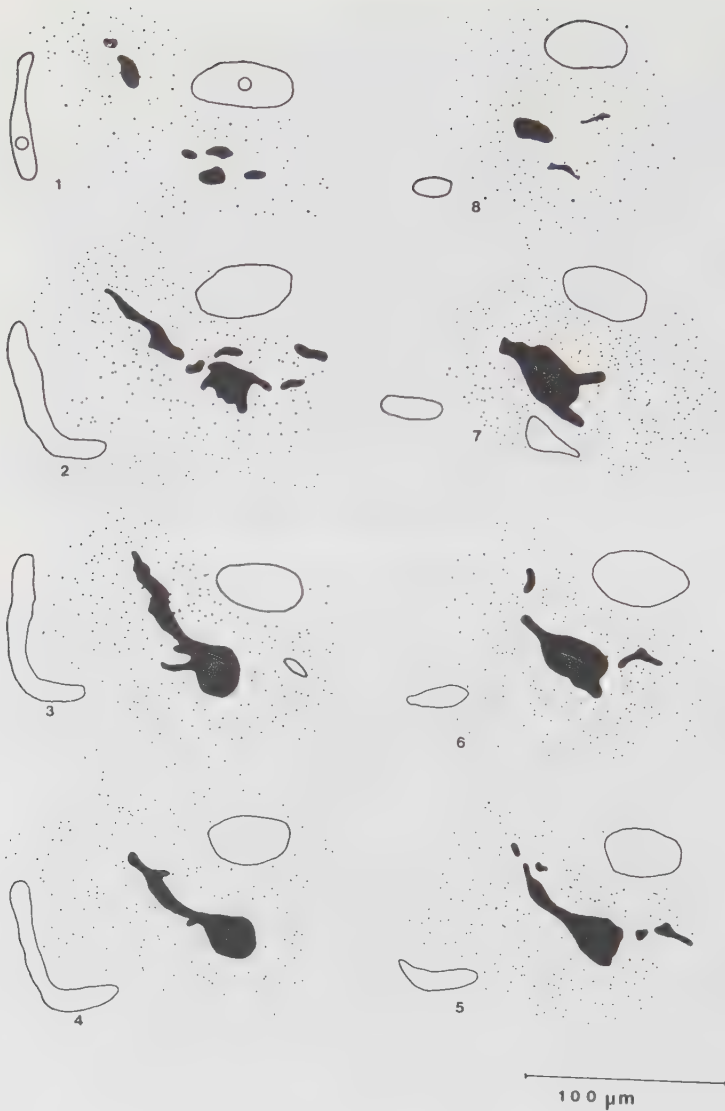


Abb. 19: Rekonstruktion einer retrograd markierten NOT-Zelle aus Serienschritten (1µm). Soma und Dendriten sind schwarz ausgefüllt. Die GABA-positiven Terminalen sind als Punkte dargestellt. Die Gefäßquerschnitte (o) dienen der Orientierung. Jeder dritte Schnitt ist gezeichnet.

3.1.1.1. Somata der NOT-Projektionsneurone

Die Konzentration GABA-positiver 'Punkte' der Fläche $\times$ war bei allen 12 retrograd markierten NOT-Zellen signifikant niedriger als die der Fläche Δ .

Die absolute Anzahl (auf eine Fläche von $100\mu\text{m}^2$ normiert) betrug innen ($\approx$ Fläche $\times$) 0.622 (SD=0.553) Terminalen/ $100\mu\text{m}^2$, außen ($\approx$ Fläche Δ) dagegen 2.628 (SD=0.983) Terminalen/ $100\mu\text{m}^2$ (s. Abb. 20a).

Die Terminalendichte der Fläche Δ beträgt demnach das 4,2-fache der Fläche $\times$ - oder: auf eine Terminale der Fläche $\times$ kommen 4.2 Terminalen der Fläche Δ .

Die Terminalendichte um ein retrograd markiertes NOT-Neuron nimmt also zur Peripherie hin deutlich zu, während sie in unmittelbarer Umgebung um dieses Neurons sehr gering ist.

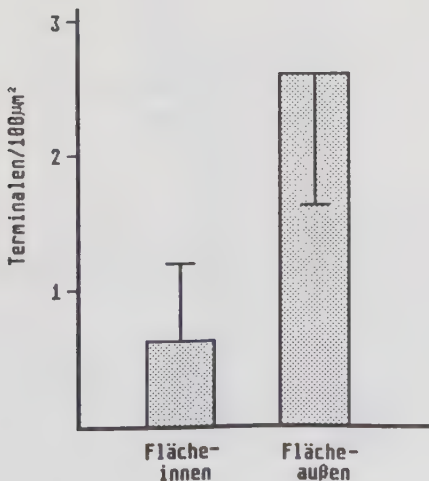


Abb. 20a: Durchschnittliche Terminalenverteilung um NOT-Projektionsneurone.

3.1.1.2. Proximale Dendriten der NOT-Projektionsneurone

Die Hälfte der analysierten Dendriten zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Terminalendichte von Fläche π zu Fläche α .

Auch ist die absolute Anzahl der GABA-positiven Terminalen, welche die Dendriten von NOT-Zellen umgeben, im Vergleich zu deren Somata höher.

So befinden sich auf der Fläche π um die proximalen Dendriten 1.263 (SD=0.834) Terminalen/100 μm^2 , das sind ca. doppelt so viel wie um die zugehörigen Somata.

Die Terminalendichte der Fläche α entspricht mit 2.42 (SD=1.178) Terminalen/100 μm^2 ungefähr den bei den Somata ermittelten Werten.

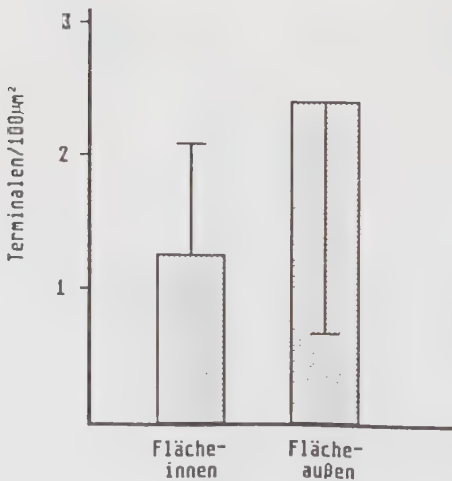


Abb. 20b: Durchschnittliche Terminalenverteilung um proximale Dendriten von NOT-Projektionsneuronen.

Der prozentuale Anteil der Terminalen der Fläche π , welche lichtoptisch direkt das Soma bzw. die proximalen Dendriten berühren, beträgt bei den Somata der retrograd markierten NOT-Zellen nur 8,6%, während er bei den zugehörigen Dendriten 13,88% ausmacht.

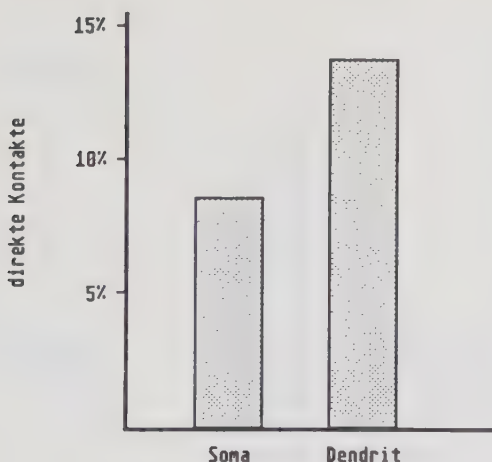


Abb. 20c: Relativer Anteil direkt berührender Terminalen von Fläche π um NOT-Projektionsneurone.

Die Absolutwerte direkt kontaktierender Terminalen verhält sich folgendermaßen:

Auf einem 100 μ m langen Umriß des Somas einer NOT-Zelle befinden sich in 1 μ m dicken Schnitten durchschnittlich 0,357 (SD=0.121) Terminalen.

Auch diese Zahl verhält sich bei den entsprechenden Dendriten anders: dort fallen auf 100 μ m Dendritenumriß durchschnittlich 1.106 (SD=0.165) Terminalen.

Der Anteil der lichtoptisch direkt die Zellmembran von NOT-Projektionsneuronen berührender Terminalen ist demnach bei den proximalen Dendriten dreimal höher als bei den zugehörigen Somata.

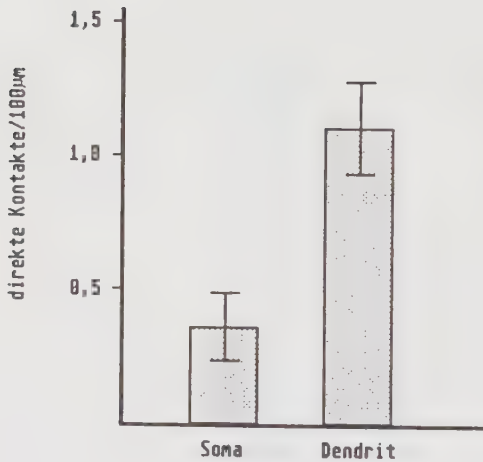


Abb. 20d: Absolute Anzahl von direkten Kontakten pro 100 μm Zellumfang in 1 μm dicken Schnitten bei NOT-Projektionsneuronen.

Bei der Berechnung der Absolutwerte wurde keine Korrektur auf Schrumpfung durchgeführt.

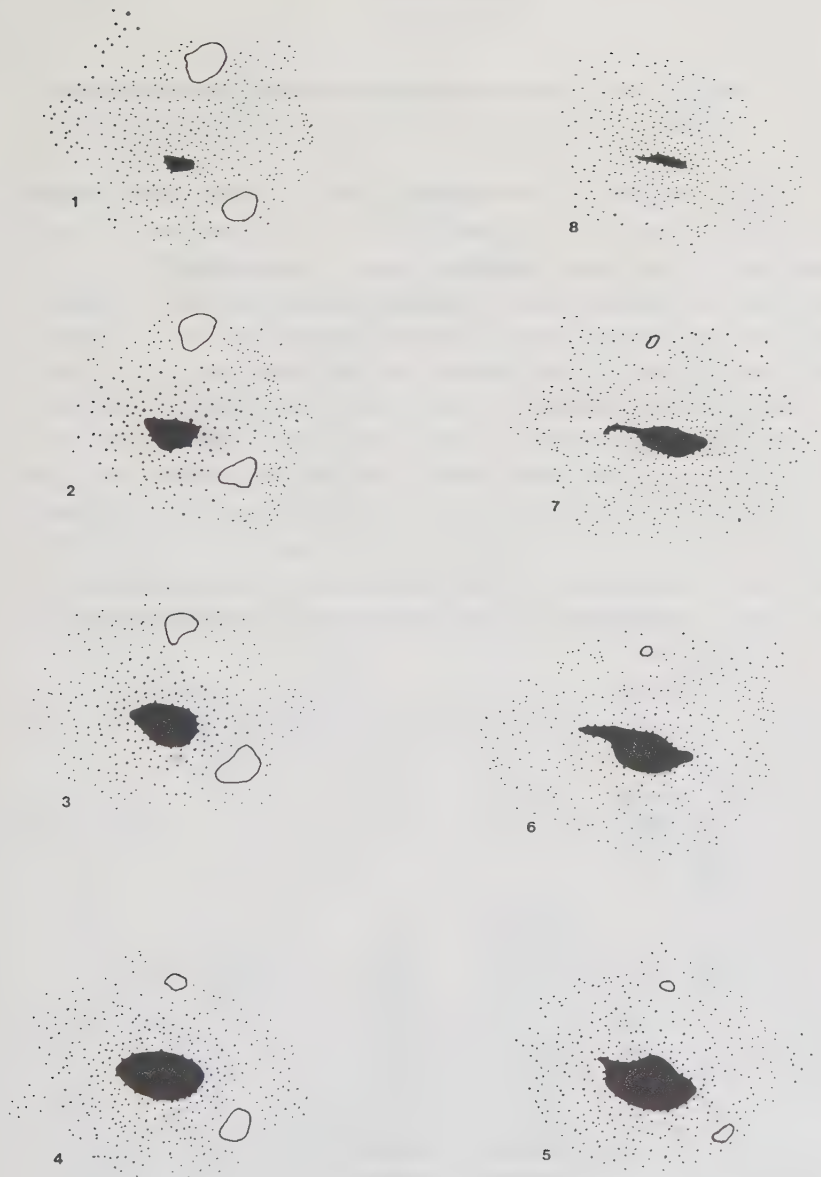


Abb. 21: Rekonstruktion einer unmarkierten NOT-Zelle (Erläuterungen s. Abb. 19).

100 μm

3.1.2. Die Analyse von nicht retrograd markierten Neuronen im NOT

Analog zu den Untersuchungen der retrograd markierten NOT-Neurone wurden Serienschritte von insgesamt vier unmarkierten Neuronen des NOT-Gebietes ausgewertet.

Die einzelnen 1 μ m dicken Querschnitte wurden rekonstruiert. Anschließend wurden pro Zelle jeweils sechs Schnitte zur endgültigen Auswertung herangezogen.

Bei der quantitativen Bestimmung der Terminalendichte zeigten alle untersuchten, nicht markierten NOT-Zellen auf der Fläche $\times$ eine signifikant höhere Konzentration an GABA-positiven Terminalen als auf der Fläche α . So befinden sich auf 100 μ m² der Fläche $\times$ durchschnittlich 7.276 (SD=1.829) Terminalen, auf einem entsprechenden Ausschnitt der Fläche α dagegen nur 5.396 (SD=1.6) Terminalen/100 μ m².

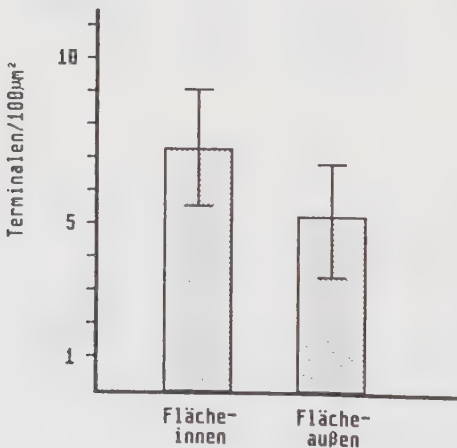


Abb. 22a: Durchschnittliche Terminalenverteilung um nicht retrograd markierte NOT-Neurone.

Der relative Anteil der Terminalen, welche direkt das Soma einer unmarkierten NOT-Zelle berühren, beträgt 26.68%, d.h., gut ein Viertel der auf der Fläche τ gelegenen Terminalen kontaktiert das Soma bzw. deren proximale Dendriten direkt.

Betrachtet man ein definiertes Teilstück der Zellmembran, so liegen auf einer Länge von $100\mu\text{m}$ bei $1\mu\text{m}$ dicken Schnitten durchschnittlich 10.25 ($\text{SD}=0.432$) Terminalen.

3.1.3. Die Analyse der Neurone im SGI des Colliculus superior

Insgesamt vier tiefe Colliculusneurone wurden auf das quantitative Verteilungsmuster der sie umgebenden Terminalen untersucht.

Die Auswertung erfolgte in gleicher Weise, wie bereits bei den NOT-Neuronen beschrieben.

Bei sämtlichen analysierten Colliculuszellen befanden sich auf der Innenfläche (Fläche τ) signifikant mehr GABA-positive Terminalen als auf der Außenfläche (Fläche α).

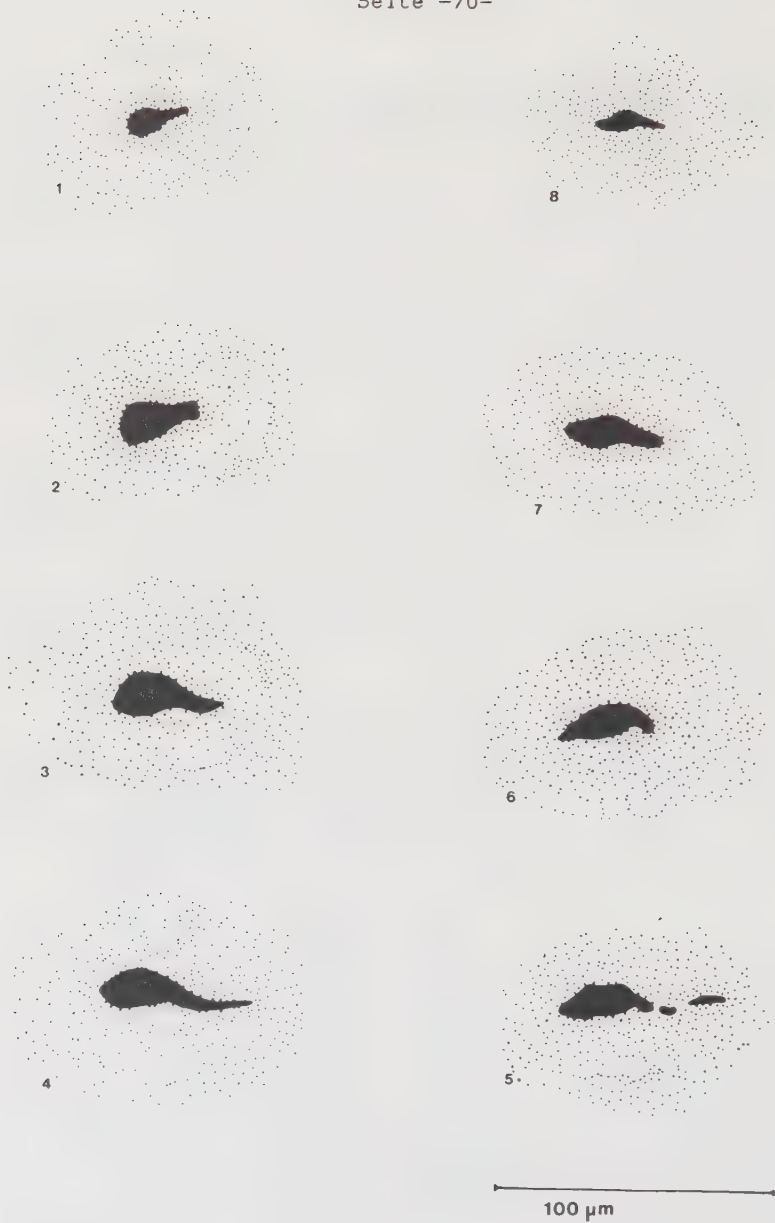


Abb. 23: Rekonstruktion einer Zelle aus dem Stratum griseum intermediale (SGI) des Colliculus superior (Erläuterung s. Abb. 19).

Auf $100\mu\text{m}^2$ der Fläche τ liegen demnach 8.043 (SD=2.429) Terminalen, auf einem entsprechenden Ausschnitt der Fläche α dagegen nur 5.517 (SD=1.7) Terminalen/ $100\mu\text{m}^2$.

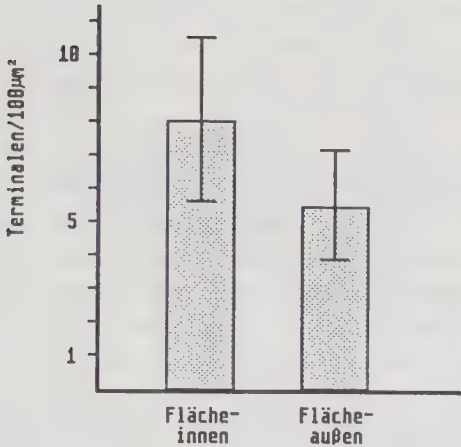


Abb. 24: Durchschnittliche Terminalenverteilung um tiefe Colliculusneurone.

Der prozentuale Anteil der Terminalen der Fläche τ , welche unmittelbar an das Soma bzw. die proximalen Dendriten angrenzen, liegt bei 27.76%. Somit berühren gut ein Viertel dieser 'inneren' Terminalen die Zellmembran eines Colliculusneurons.

Die Analyse eines $100\mu\text{m}$ langen Teilstücks der Zellmembran ergibt bei $1\mu\text{m}$ Schnittdicke einen Terminalenbesatz von 11.19 (SD=3.9) Terminalen/ $100\mu\text{m}$.

4. Vergleichende Ergebnisse der Terminalenverteilung Zellpopulationen des NOT - SGI des Colliculus superior

Betrachtet man nun die Einzelergebnisse, so stellt man fest, daß sich die tiefen Colliculusneurone und die nicht markierten NOT-Neurone bezüglich der sie umgebenden Terminalenverteilung sehr ähnlich verhalten.

Beide Zellpopulationen weisen auf der sie unmittelbar umgebenden Innenfläche (Fläche α) einen signifikant höheren GABA-positiven Terminalengehalt auf der peripherer gelegenen Fläche α .

Bei beiden beträgt der relative Anteil direkt kontaktierender Terminalen der Fläche α gut 25%.

Der absolute Anteil unmittelbar die Zellgrenze berührender Terminalen gestaltet sich ebenfalls sehr ähnlich (10.25 Terminalen auf 100 μ m Zellmembran bei nicht markierten NOT-Neuronen bzw. 11.19 Terminalen auf 100 μ m Zellmembran bei den tiefen Colliculusneuronen).

Ganz anders dagegen gestalten sich die Verhältnisse bei den NOT-Projektionsneuronen bzw. deren proximalen Dendriten.

Die mittlere Terminalendichte der unmittelbar die Zellgrenze dieser Neurone umgebenden Fläche α ist signifikant niedriger als auf der peripherer gelegenen Fläche α . Bei der Analyse ihrer proximalen Dendriten tritt dieser signifikante Unterschied jedoch nur in 50% der ausgewerteten Fälle auf.

Weiterhin fällt auf, daß der relative Terminalengehalt der 'inneren' Fläche α der untersuchten Dendriten den entsprechenden Wert bei den zugehörigen Somata um das Doppelte übersteigt.

Die absolute Anzahl der direkt an die Zellmembran angrenzenden Terminalen beträgt bei den Dendriten von NOT-Projektionsneuronen sogar das Dreifache des entsprechenden Wertes ihrer Somata.

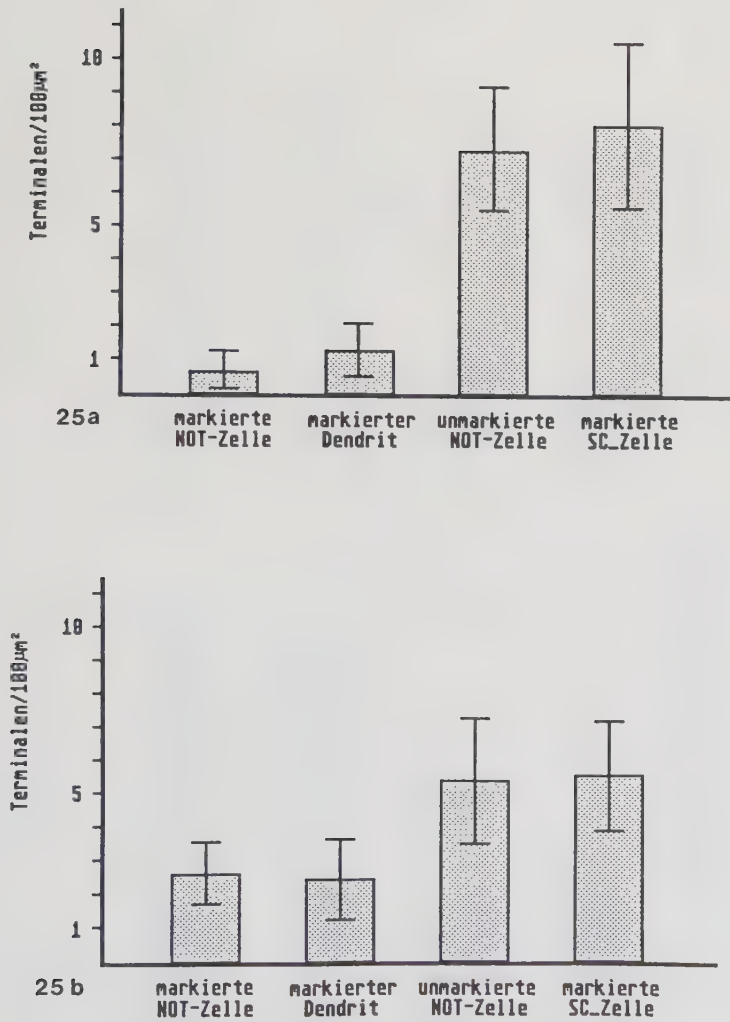


Abb. 25: a.) Darstellung der durchschnittlichen Terminalenverteilung der Fläche x , b.) der Fläche a .

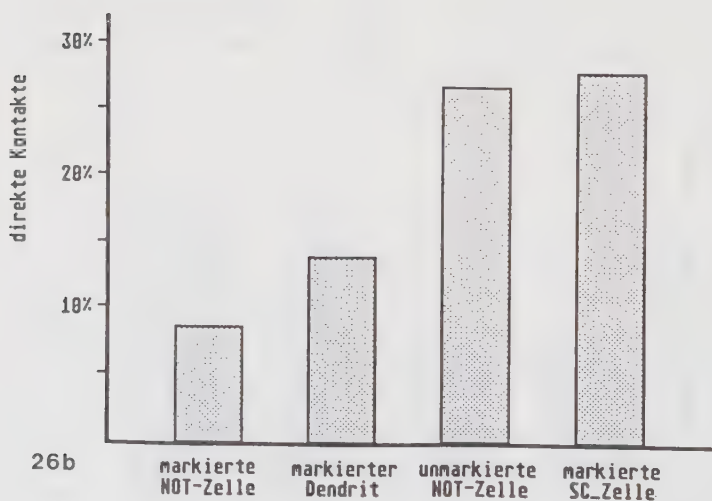
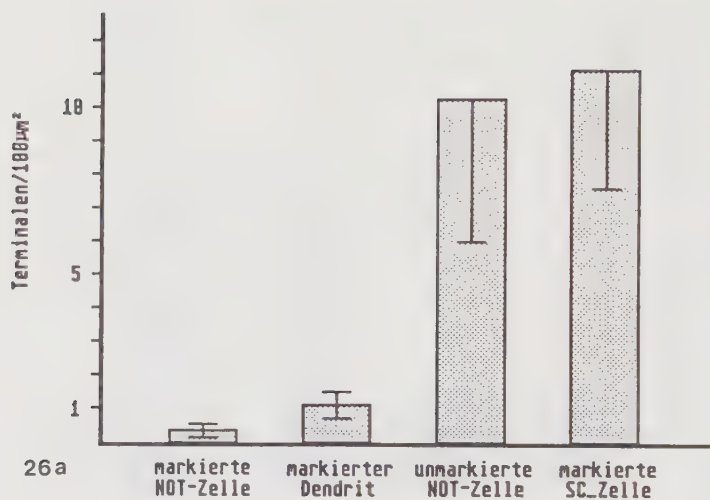


Abb. 26: a.) Absolutwerte der direkten Kontakte, b.) prozentualer Anteil direkt berührender Terminalen der Fläche $\times$, vergleichend.

D Diskussion

1. Histologie

Zur Analyse der räumlichen Beziehung zwischen GABA-positiven Zellstrukturen und praetecto-olivären NOT-Projektionsneuronen bzw. anderen Neuronenpopulationen des Praetectums mußte die gleichzeitige Darstellung dieser Neurone und die von gabaergen Zellelementen in einem Schnitt gelingen.

Eine quantitative Untersuchung der Terminalenverteilung erfordert zudem eine sehr geringe Schnittdicke, da ansonsten eine vollzählige Erfassung der gabaergen 'Punkte' aufgrund ihrer geringen Größe und der begrenzten Eindringtiefe des Antikörperserums nicht gewährleistet ist.

Durch die hohe lichtmikroskopische Auflösung der Semidünnschnitte war zudem eine viel exaktere Untersuchung der tatsächlichen räumlichen Beziehung von Terminalen zu den Dendriten bzw. Somata der verschiedenen Neuronenpopulationen möglich, als dies bei der Analyse von dickeren Schnitten der Fall wäre. Anhand des semidünn geschnittenen Materials konnte überprüft werden, ob die gabaergen Terminalen nun tatsächlich direkt die Zellmembran eines Neurons kontaktieren, oder ob sie nur in der näheren Umgebung dieses Neurons lokalisiert sind.

1.1. Injektionsstelle der Oliva inferior

Durch die stereotaktische Lokalisation des Injektionsortes wurde nicht nur die dorsale Kappe der Oliva inferior erfaßt, sondern noch weitere Bereiche der Oliva inferior bzw. des Hirnstamms.

Die dadurch mitgetroffenen efferenten Bahnen anderer Projektionen führten unter anderem zur retrograden

Markierung von Neuronen im PP, im DTN (dorsaler terminaler Nucleus) und im SGI des Colliculus superior.

Das Ziel lag hierbei in einer möglichst vollständigen Erfassung der praetecto-olivaren Fasern, um eine optimale Markierung der NOT-Projektionsneurone sicherzustellen.

Eine zusätzliche Markierung weiterer Neuronenpopulationen störte in meinen Untersuchungen nicht - ließ sich im Falle der colliculo-olivaren Projektion sogar als Referenzstruktur ausnutzen.

1.2. Retrograde Markierung - Doppelmarkierung

Die richtungsspezifischen Projektionsneurone des NOT lassen sich mit geeigneten Tracersubstanzen durch Injektion in die dorsale Kappe der Oliva inferior markieren.

Retrograde Tracertechniken bieten sich für die selektive Darstellung dieser Neurone in besonderem Maße an.

Es existieren eine ganze Reihe von Tracersubstanzen, welche nach lokaler Applikation in ein bestimmtes Kerngebiet im ZNS von den dort liegenden Terminalen aufgenommen werden, und durch retrograden Transport in die Somata bzw. Dendriten der entsprechenden Neurone gelangen.

Die Sichtbarmachung dieser Tracersubstanzen erfolgt dann entweder durch Reaktion mit einem Chromogen oder - bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen durch Wahl einer geeigneten Anregungswellenlänge bzw. eines geeigneten Filters am Mikroskop.

Zur Bestimmung der Transmittereigenschaften bestimmter Neuronenklassen versucht man bereits seit einiger Zeit, sowohl die zu analysierende Neuronenpopulation als auch die Identität ihres Neurotransmitters durch die Kombination zweier Markierungstechniken in einem histologischen Bild darzustellen.

Kuypers et al (1977) markierte bestimmte Projektionsneurone mit Fluoreszenzfarbstoffen, die Transmittercharakterisierung gelang ihm mit immunfluoreszenztechnischen Methoden (Bjorklund et al., 1979).

Auch eine Kombination der MRP-Markierung mit Immunfluoreszenztechniken ist beschrieben (Berger et al., 1975; Blessing et al., 1978).

Desgleichen wurde die Kombination MRP-Methode/Immuncytochemie schon mehrfach angewandt (Ljungdahl et al. 1975; Lu et al., 1985; Montero, 1986).

Für meine Untersuchungen eignete sich die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als Markersubstanz nicht, da Fluoreszenzfarbstoffe grundsätzlich nicht sehr stabil sind und während der anschließenden immuncytochemischen Prozedur wieder vollständig aus den Zellen ausgewaschen werden.

Außerdem erfordern diese Farbstoffe eine reine Formaldehydfixierung. Dies steht im Widerspruch zur Anwesenheit von Glutaraldehyd in der Fixierlösung, auf welches bei der GABA-Immunhistochemie nicht verzichtet werden kann (s. 1.3.).

Bei sämtlichen Doppelmarkierungsverfahren muß hinsichtlich der Fixierung und Gewebepreparation ein Kompromiß gefunden werden, der sowohl der stabilen Markierung einzelner Projektionsneurone als auch der Darstellung der zu analysierenden Transmittereigenschaften gerecht wird - also zwischen optimalen Bedingungen für beide Einzelmethode liegt.

Zum Nachweis der retrograd transportierten MRP stehen mehrere Reagenzien zur Verfügung, wie z.B. Diaminobenzidin (DAB; Graham und Karnowski, 1966), Hanker-Yates (HY; Hanker et al., 1977) und Tetramethylbenzidin (TMB; Mesulam, 1978).

Sämtliche Nachweisreagenzien sind jedoch relativ instabil und neigen dazu, während der sich anschließenden Immuncytochemie wieder aus den Zellen herauszudiffundieren.

Eine Verbesserung der Intensität sowie der Stabilität wird durch die Schwermetallintensivierung der DAB-Reaktion mit CoCl_2 (Adams, 1977) und durch die Bereitstellung des H_2O_2 mit GOD (Glucoseoxidase) und β -D-Glucose (Itoh et al., 1979) erreicht.

Als Resultat erhält man ein granulär schwarzes Reaktionsprodukt in den Somata der markierten Zellen, welches sich deutlich von der homogenen Braunfärbung der PAP-Immuncytochemie unterscheiden läßt (Bowker et al., 1982; Wainer und Rye, 1984; Horn und Hoffmann, 1987).

Der Nachteil dieser Methode liegt in dem hohen histologischen Hintergrund und der relativ groben Empfindlichkeit der DAB-Reaktion (Penney et al., 1983).

Von sämtlichen Nachweisreagenzien besitzt das TMB zwar die höchste Sensitivität, wird jedoch vor allem durch alkoholische Lösungen und neutrale Puffer auch wieder sehr leicht ausgewaschen.

Durch das von Rye et al. (1984) entwickelte Stabilisierungsverfahren mit DAB/ CoCl_2 (nach Adams, 1977) im Anschluß an die TMB-Nachweisreaktion wurde die hohe Sensitivität der TMB-Methode nicht beeinträchtigt, die Stabilität des Reaktionsproduktes jedoch enorm verbessert. Eine weitere Stabilitätserhöhung konnte erzielt werden, wenn die DAB/ CoCl_2 -Lösung leicht (auf ca. 35°C) angewärmt wurde.

Ein zusätzlicher Stabilisierungsschritt in Form einer Ammoniumheptamolybdat-Nachreaktion (Horn und Hoffmann, 1987) - zwischen der TMB-Reaktion und der DAB/ CoCl_2 -Stabilisierung eingebaut - verhindert ein vorzeitiges Herausdiffundieren der TMB-Moleküle vor der eigentlichen DAB/ CoCl_2 -Nachreaktion. Auf diese Weise konnte die Markierungsdichte weiter verbessert werden.

Erst durch die Kombination TMB-Reaktion/ Ammoniumheptamolybdat - Stabilisierung/DAB- CoCl_2 -Nachreaktion war es möglich, die Stabilität des MRP-Reaktionsproduktes soweit zu steigern, daß es die nachfolgenden Prozeduren der Harzeinbettung, der Entharzung und der Immuncytochemie ohne

allzu starkes Ausbleichen überstand. Ein gewisser Verlust an Farbtintensität konnte trotz diesen eingebauten Stabilisierungsverfahren nicht ganz vermieden werden. Die MRP-Granula in den markierten Zellen erscheinen nach der Immuncytochemie nicht mehr so kräftig schwarz und dicht gepackt, sondern eher blaß-grau und etwas mehr 'aufgelockert', konnten aber von der homogenen Braunfärbung gabaerger Zellstrukturen trotzdem noch gut unterschieden werden.

Die Nachweisreaktion der transportierten MRP wurde an den sehr dicken (200µm) Vibratomschnitten durchgeführt.

Um eine ausreichende Eindringtiefe der einzelnen Reagenzien gewährleisten zu können, ließ man sämtliche Inkubationsstufen auf einem Schüttler ablaufen; der Einsatz von Detergenzien wie Triton-X-100 oder Saponin war dann nicht mehr notwendig.

1.3. GABA-Immuncytochemie

Das GABA-Molekül als einzelne Aminosäure ist zu klein, um vom Immunsystem als Antigen erkannt zu werden. Damit GABA überhaupt erst immunogene Eigenschaften entwickeln kann, muß die Aminosäure als Hapten an ein Makromolekül wie Rinderserumalbumin (BSA = bovine serum albumin) gekoppelt werden. Erst dann erlangt es vollantigene Wirksamkeit.

Glutaraldehyd dient dabei als Bindeglied zwischen GABA auf der einen und Lysinresten des BSA-Makromoleküls bzw. der Membranproteine im Gewebe auf der anderen Seite (Hardy et al., 1976).

Im Gewebe erkennt der Antikörper nämlich nicht nur das einzelne GABA-Molekül, sondern das Konjugat aus GABA, Glutaraldehyd und Lysin.

Dieser GABA-Glutaraldehyd-BSA-Komplex wurde Kaninchen injiziert. Nach Eintreten einer ausreichenden Immunantwort,

d. h. eines genügend hohen Antikörpertiters wird der GABA-Antikörper aus dem Blutserum dieser Tiere extrahiert und gereinigt.

Jede auf die Injektion eines Antigens in einem warmblütigen Tier gebildete Antikörperpopulation ist heterogen. So werden nach der Injektion eines beliebigen Antigens Antikörper gebildet, die verschiedenen Ig-Klassen und -Subklassen angehören.

Analog zu dieser Strukturheterogenität der gebildeten Antikörperpopulation besteht auch eine Heterogenität bezüglich der Affinität zum Antigen.

Im allgemeinen dominieren in einer derart gebildeten Antikörperpopulation die Antikörper mit einer mittleren Affinität zum Antigen, während Antikörper mit hoher und niederer Affinität relativ selten sind.

Bezüglich der Affinität zum Antigen zeigt also die Antikörperpopulation im Serum eines Individuums, die gegen ein Hapten gebildet wurde, eine Normalverteilung. Nur unter ganz bestimmten Umständen werden relativ homogene Antikörperpopulationen gebildet (z.B. Ig-Bildung in Myelomen).

Sehr wichtig im Hinblick auf die Heterogenität der gebildeten Antikörper ist die Antigendosis.

Eine hohe Dosis induziert in der Regel eine hohe Anfangskonzentration von Serumantikörpern, die aber rasch wieder abfällt. Im Anschluß daran bleiben nur relativ niedere Titer von Antikörpern mit geringer Affinität zum Antigen übrig.

Wählt man dagegen eine niedrigere Antigendosis, so erhält man zwar geringere Anfangsspiegel von Serumantikörpern, später bleiben jedoch relativ hohe Konzentrationen hochaffiner Antikörper im Serum zurück.

Neben Art und Dosis des verwendeten Antigens besitzen auch Zusätze und Adjuvantien einen Einfluß auf die Konzentration und Affinität der gebildeten Antikörper. Ferner unterliegt die Qualität der gebildeten Antikörper

starken altersbedingten und genetischen Einflüssen (Rolle und Mayr, 1978).

Nach der Immunisierungsreaktion mit dem Aminosäure-Glutaraldehyd-BSA-Komplex sind hochspezifische (hochaffine), die gebundene Aminosäure erkennende Antikörperpopulationen immer mit weniger spezifischen (affinen) Antikörpern, die in erster Linie gegen das Trägerprotein oder den Glutaraldehyd-anteil gerichtet sind, kontaminiert.

Um eine ausreichende Spezifität des extrahierten Antikörperserums zu gewährleisten, muß dieses unbedingt gereinigt werden, was z.B. durch bestimmte Absorptionstechniken mit Glutaraldehyd-gekoppelten Trägerproteinen ohne weiteres möglich ist (Storm-Mathisen et al., 1983; Ottersen und Storm-Mathisen, 1984; Wenthold et al., 1986; Pourcho und Goebel, 1985).

Eine andere Möglichkeit bietet sich in der Produktion monoklonaler Antikörper gegen den Aminosäure-Glutaraldehyd-Carrier-Komplex und anschließender Isolierung von nur solchen Antikörper Populationen, die selektiv mit der Aminosäureseite in Wechselwirkung treten (Matute und Streit, 1986).

Der Nachteil dieser monoklonaler Antiseren ist ihre oft zu ausgeprägte Selektivität, d.h., sie erkennen meist nur spezifische Antigen-Untereinheiten der Aminosäure/ Glutaraldehyd-Konjugate im Gewebe. Im allgemeinen sind sie aber sensitiver als polyklonale Antiseren, welche zwar ein breiteres 'Erkennungsspektrum' gegenüber den verschiedenen Aminosäure-Glutaraldehyd-Konjugaten im Gewebe besitzen, dadurch aber auch öfters zu unspezifischen Hintergrundmarkierungen führen.

Letztendlich unterscheiden sich die Ergebnisse monoklonaler Antikörperseren jedoch nicht wesentlich von Untersuchungen, die polyklonale Antikörperseren benutzten (Ottersen und Storm-Mathisen, 1984).

Zur selektiven Markierung gabaerger Zellelemente wurden in meinen Untersuchungen zwei verschiedene polyklonale GABA-Antisera (Fa. Immuno Nuclear) benutzt.

Während bei der ersten Antikörpercharge Verdünnungen von 1:3000 bis 1:4000 für einwandfreie Markierungen ausreichend waren, lieferte die zweite Charge durchweg schwächere und erst bei einer Verdünnung von 1:1000 und darunter auswertbare Ergebnisse.

Möglicherweise ist ein nicht ganz einwandfreies Extraktions- bzw. Reinigungsverfahren der Grund für die schlechteren Markierungseigenschaften der zweiten Antikörpercharge in meinen Experimenten oder das Antikörperserum enthielt aus einem der oben genannten Gründe einen zu hohen Anteil an Antikörpern mit niedriger Affinität zum Antigen.

Die Ursache kann jedoch auch in dem fehlerhaften Ansatz der Vorverdünnung liegen.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, daß die Antikörpercharge durch unsachgemäße Lagerung oder Transport Schäden erlitten hat und die chemische Konfiguration der Bindungsstelle des Antikörpers sich so veränderte, daß ein einwandfreies 'Erkennen' des Antigens nicht mehr gewährleistet war.

Im Hinblick auf die Antigenstruktur nimmt Glutaraldehyd als Bindeglied zwischen GABA einerseits und Lysinresten von Proteinen andererseits eine zentrale Stellung ein. Es ist jedoch nicht nur am Zustandekommen des letztendlich nachweisbaren Antigens beteiligt, sondern verhindert auch ein vorzeitiges Wegdiffundieren der GABA-Moleküle aus den Zellen, indem es diese an die Lysinreste der entsprechenden Membranmoleküle koppelt.

Aus diesem Grunde kann auf die Anwesenheit einer bestimmten Menge Glutaraldehyd in der Fixierlösung nicht verzichtet werden.

Zu hohe Glutaraldehydkonzentrationen in der Fixierlösung bewirken jedoch wiederum unerwünschte Effekte, nämlich ein Nachlassen der Immunreaktivität durch Maskierungsphaenomene (Horn und Hoffmann, 1987). Es kommt dann zur vermehrten Ausbildung unspezifischer Bindungen und das Eindringvermögen der Antisera wird durch die Quervernetzung der Membranmoleküle erschwert.

Um dies zu vermeiden, wurde mit zwei unterschiedlich konzentrierten Fixierlösungen nacheinander perfundiert. Die erste enthielt 1% Glutaraldehyd - die optimale Konzentration für die TMB-Methode-, anschließend wurde mit einer 0.1% Glutaraldehyd-haltigen Lösung nachgespült.

Die Fixierlösungen der ersten beiden Experimente enthielten sogar 1.25% Glutaraldehyd, was jedoch in meinen Experimenten keine bemerkenswerte Qualitätsminderung der Immunreaktivität zur Folge hatte.

Insbesondere die gabaergen Somata und Terminalen ließen sich an den Semidünnschnitten deutlich und selektiv markieren, Axone und Dendriten dagegen wurden oft nur andeutungsweise dargestellt. Dies liegt jedoch nicht daran, daß der endogene Transmittergehalt in diesen Kompartimenten sehr viel niedriger wäre (Fonnum et Walberg, 1973), sondern daran, daß die Fortsätze in den semidünnen Schnitten sehr schnell aus der Schnittebene verschwinden; d.h., beim Anfertigen der Serienschnitte einfach 'abgeschnitten' werden.

Bisweilen sind die Anfangsabschnitte eines Dendriten noch als mit dem Soma verbundene Zellfortsätze auf einem Schnitt zu erkennen, sie verlieren jedoch immer sehr bald ihre Verbindung zur Herkunftszelle.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren fand auch ich in meinen Untersuchungen keine spezifisch angefärbten Gliazellen (Ottersen und Storm-Mathisen, 1984; Somogyi et al., 1985; Horn und Hoffmann, 1987).

Gliazellen sind maßgeblich am Abbau von GABA beteiligt

(s. Einl. 3.1.). Dort wird es über Glutamat zu Glutamin umgewandelt und als solches wieder ausgeschieden. Dieser Metabolismus läuft sehr wahrscheinlich so schnell ab, daß der dadurch sehr niedrig gehaltene endogene Transmittergehalt in den Gliazellen für eine selektive immuncytochemische Markierung nicht ausreicht.

Die bisher am besten untersuchte Markersubstanz für GABA-positive Strukturen ist das Syntheseezym GAD (Glutamatdecarboxylase).

Vergleiche zwischen GAD- und GABA-positiven Zellstrukturen zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der Verteilung oder der Morphologie der markierten Neurone (Ottersen und Storm-Mathisen 1984; Somogyi et. al, 1985). Im allgemeinen neigen GABA-Antiseren durch ihre Glutaraldehyd-BSA-Kopplung zu einer etwas stärkeren, unspezifischen Hintergrundfärbung, können erfahrungsgemäß jedoch als selektive Marker für gabaerge Zellelemente angesprochen werden (Montero und Zempel, 1986).

Auf eine Gegenfärbung des immuncytochemisch behandelten Materials wurde verzichtet, um eine Überfärbung und damit ein Übersehen der zarten GABA-positiven Strukturen in den semidünnen Schnitten zu vermeiden.

1.4. Post-Embedding-Methode

Die in dieser Arbeit angewandte 'Post-Embedding-Methode' (in Anlehnung an Montero und Zempel, 1985) bringt gegenüber der schon länger etablierten 'Pre-Embedding-Methode' Vor- und Nachteile. Die prinzipiellen Unterschiede der beiden Verfahren sollen im folgenden kurz erläutert werden:

Bei der Pre-Embedding -Methode wird das Gewebe - wie der Name schon sagt - vor der Harzeinbettung dem angestrebten Markierungsverfahren unterzogen. Sämtliche Markertechniken sind also vor der Weiterverarbeitung zu Semi- bzw. Ultradünnschnitten abgeschlossen.

Alle Nachweisreaktionen werden an relativ dicken Gefrier- bzw. Vibratomechnitten durchgeführt. Dies hat bei immuncytochemischen Verfahren den Nachteil, daß die Eindringtiefe des Antikörperserums auf wenige μm begrenzt ist. Den limitierenden Faktor für die Eindringtiefe bildet dabei nicht nur das Molekulargewicht der Antikörper, sondern auch der PAP-Komplex. Durch Einsatz von kleineren Fab-Fragmenten anstelle von ganzen Antikörpermolekülen konnten bereits 50 μm dicke Schnitte über ihre gesamte Tiefe hindurch markiert werden (Brandon, 1985). Die Anwendung dieser Fab-Fragmente ist jedoch noch wenig etabliert.

Zur Beantwortung meiner Fragestellung bot sich mir diese Pre-Embedding-Methode als weniger geeignetes Verfahren, da eine quantitative Analyse der Terminalendichte um ein bestimmtes Neuron, dessen Somadurchmesser allein ca. 20 μm beträgt, wegen dem limitierten Penetrationsvermögen des Antikörpers erst gar nicht möglich gewesen wäre.

Eine objektive Analyse der Terminalenverteilung um bestimmte Neuronenpopulationen erfordert die serienmäßige Aufarbeitung dieser Zellen mit anschließender Immuncytochemie an sehr dünn geschnittenem Material, um eine vollständige Durchdringung der Schnitte mit den einzelnen

Antiseren gewährleisten zu können.

Doch auch dieses, als 'Post-Embedding-Methode' bezeichnete Vorgehen hat seine Nachteile. So mußte als Nachweisreaktion der retrograd transportierten MRP ein modifiziertes, aufwendiges Verfahren angewandt werden (s. 1.2.), um die Markierung der Zellen während den sich anschließenden Schritten der Harzeinbettung, der Entharzung und der Immuncytochemie stabil zu halten.

Die Farbintensität der ursprünglich kräftig schwarzen MRP-Granula litt nämlich nicht nur unter den verschiedenen Spülungen während der Immuncytochemie, sondern auch die einzelnen Stufen der Harzeinbettung erwiesen sich als kritischer Faktor.

So mußten die Zeiten der aufsteigenden Alkoholreihe möglichst kurz gehalten werden, ohne dabei eine mangelhafte Entwässerung und Harzdurchdringung des Gewebes zu riskieren.

Desweiteren konnte eine enorme Zell- und Gewebeschrumpfung als Folge der Harzeinbettungsprozedur nicht vermieden werden. Aus diesem Grunde waren objektive Angaben über absolute Größen- und Flächenverhältnisse der untersuchten Neuronenpopulationen nicht möglich.

Eine mehr oder weniger starke Ausbleichung der MRP-Granula ließ sich ebenfalls nicht ganz verhindern.

Die ursprünglich kräftig schwarzen Granula erschienen nach der Immuncytochemie blaß-grau und in geringerer Dichte die Zellen ausfüllend, konnten von den braunen GABA-positiven Zellelementen jedoch nach wie vor gut unterschieden werden.

Als weiterer, für das Gelingen der Immuncytochemie sehr kritischer Punkt erwies sich der letzte Schritt vor der Antikörperbeschichtung: die Entharzung der Semidünnschnitte.

Sowohl zu lange als auch zu kurze Entharzungszeiten beeinträchtigten das immuncytochemische Ergebnis erheblich.

Eine Entharzung der Semidünnschnitte vor der immunhistochemischen Prozedur ist für die Bindung des

Antikörpers an das Antigen im Gewebe unbedingt erforderlich.

Durch die Durchtränkung des Gewebes mit dem Kunstharzgemisch sind sämtliche Oberflächen zellulärer Strukturen von einem 'Harzfilm' überzogen, der somit auch die determinante Gruppe des Antigens für den Antikörper maskiert.

Durch den Vorgang der Entharzung wird die Bindungsstelle des Antigens praktisch wieder 'freigelegt'. Dies muß so schonend wie möglich geschehen, damit durch die Aggressivität des Entharzungsmediums erstens die Gewebeerhaltung nicht wesentlich beeinträchtigt wird und zweitens die chemische Konfiguration der determinanten Gruppe des Antigens nicht so modifiziert wird, daß sie vom Antikörper gar nicht mehr erkannt werden kann.

Kritisch bei diesem Arbeitsgang waren vor allem die Dauer der Entharzungszeit und das Alter des Entharzungsmediums. So mußten vor jeder Immunreaktion mehrere Modifikationen in Entharzungszeit und in der Verwendung unterschiedlich alter Methylate ausgetestet werden, um zufriedenstellende, immuncytochemische Ergebnisse zu erhalten.

Die im Anhang angegebenen Zeiten für die einzelnen Entharzungsstufen sind deshalb nur als Richtwerte zu betrachten, die je nach Stabilität des zu entharzenden Gewebes nach oben bzw. nach unten moduliert werden müssen.

Die unterschiedlichen Resistenzen der einzelnen Schnittserien gegenüber der Einwirkung des Methylats haben ihre Ursache wahrscheinlich in der wohl nicht immer ganz gleichmäßigen Konsistenz des Harzpolymerisats und in qualitativen Unterschieden der Gewebsfixierung.

Ein weiterer großer Nachteil der Entharzungsprozedur ist die durch die Aggressivität des Mediums bedingte starke Ausbleichung der retrograd markierten Zellen. Allein schon aus diesem Grunde sollten die Zeiten so kurz wie möglich gehalten werden.

Von diesen Nachteilen abgesehen, bietet die Post-Embedding-Methode an Semidünnschnitten ein geeignetes Verfahren, sehr kleine zelluläre Strukturen wie Terminalen quantitativ zu erfassen und selektiv darzustellen.

2. GABA-immunreaktive Strukturen im NOT

2.1. GABA-immunreaktive Neurone im NOT

Der prozentuale Anteil GABA-positiver Neurone an der Gesamtneuronenpopulation des NOT wurde bereits bei verschiedenen Spezies untersucht (s. Einleitung).

Die Autoren beschreiben einen relativ hohen Anteil GABA-immunreaktiver Zellstrukturen im NOT höherer Vertebraten.

Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen meiner Untersuchungen. Die immunocytochemischen Markierungen bestätigen die Existenz einer hohen Anzahl GABA-positiver Neurone im NOT der Katze.

Aufgrund der massiven Zell- und Gewebeschrumpfung in meinem Material verzichtete ich auf eine Flächenberechnung dieser Zellen. Rein subjektiv entsteht jedoch auch in meinen Bildern der Eindruck, daß diese GABA-positiven Neurone etwas kleiner sind als z.B. die retrograd markierten Projektionsneurone des NOT oder die tiefen Colliculusneurone.

2.2. GABA-immunreaktive Terminalen im NOT

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (s. Einleitung) konnte ich in meinen Untersuchungen eine relativ hohe Dichte GABA-positiver Terminalen im NOT nachweisen.

Durch die quantitative Auswertung des Verteilungsmusters GABA-positiver Terminalen um verschiedene Neuronenpopulationen konnte gezeigt werden, daß die Somata von NOT-Projektionsneuronen einen viel schwächeren gabaergen Eingang erhalten als z.B. andere, nicht retrograd markierte Neurone des NOT-Areals.

Die proximalen Dendriten der NOT-Projektionsneurone sind jedoch - soweit untersucht - deutlich stärker mit GABA-positiven Terminalen assoziiert als deren Somata.

In diesem Zusammenhang möchte ich darauf hinweisen, daß sich die Auswertung der Terminalendichte um die Dendriten von NOT-Neuronen z.T. recht schwierig gestaltete.

Der Verlauf eines Dendriten konnte - aufgrund der sehr dünnen Schnitte - immer nur auf ein kurzes Stück verfolgt werden.

Die Feinheit der Dendriten bedingte zudem einen - im Verhältnis zum Soma - sehr niedrigen Gehalt an MRP, welcher die Prozedur der Entharzung und der Immuncytochemie nicht immer unbeschadet überstand. So waren einzelne Dendritenabschnitte im Anschluß an die Immuncytochemie infolge des starken Ausbleichens oft nicht mehr eindeutig als solche zu erkennen.

Völlig unmöglich war zudem eine weitere Differenzierung zwischen Dendriten und dem noch dünneren Axon der retrograd markierten Neurone im immuncytochemischen Bild.

Eine einwandfreie Auswertung der Terminalendichte um die Fortsätze eines NOT-Projektionsneurons war nur an solchen Schnittserien möglich, an denen die Dendriten nach der Immuncytochemie noch zu identifizieren waren.

Bei der Untersuchung von nicht retrograd markierten Zellen gestaltete sich die Identifizierung der zugehörigen Fortsätze mangels Markierung noch schwieriger bzw. nicht durchführbar, weshalb hier auf eine getrennte Analyse Soma - Dendrit verzichtet wurde.

Die unmarkierten NOT-Neurone zeigen im immuncytochemischen Bild bezüglich ihres Terminalenbesatzes große Ähnlichkeit mit den stark gabaerg beeinflussten tiefen Colliculusneuronen.

Zusammenfassend lassen sich anhand ihrer Morphologie, ihrer Immunreaktivität gegenüber dem GABA-Antiserum und ihrer räumlichen Beziehung zu GABA-positiven Terminalen im NOT der Katze folgende Zellpopulationen charakterisieren:

1. Relativ große, von der Oliva inferior her retrograd markierte NOT-Projektionsneurone mit schwachem Besatz gabaerger Terminalen. Die Somata dieser NOT-Neurone sind im lichtmikroskopischen Bild von einem typischen 'hellen Hof' umgeben, der durch die geringe Dichte gabaerger Terminalen in diesem Bereich gekennzeichnet ist.
2. Vergleichbar große, jedoch nicht retrograd markierte Neurone, die einen starken, den tiefen Colliculusneuronen entsprechenden Besatz mit gabaergen Terminalen aufweisen.
3. Kleinere Zellen, welche sich durch ihre kräftige, homogene Braunfärbung gut von der Umgebung abheben und somit selbst als GABA-immunreaktiv anzusprechen sind (s. 2.1.).

Viele neuronale Verarbeitungsprozesse beruhen auf dem Vorhandensein inhibitorischer Schaltmechanismen.

Der am häufigsten benutzte Neurotransmitter derartiger Systeme im ZNS höherer Vertebraten ist GABA, wie durch zahlreiche neuropharmakologische und histochemische Studien immer wieder gezeigt werden konnte.

So ist GABA am Zustandekommen charakteristischer Antworteigenschaften wie die der Richtungs- und Orientierungsspezifität bestimmter Neuronenpopulationen im visuellen Cortex maßgeblich beteiligt (Sillito, 1979).

Somogyi et al. (1984) machen für inhibitorische Einflüsse im Bereich der sensorischen Hirnrinde die Existenz bestimmter Neuronenpopulationen verantwortlich, welche zwar alle GABA als Transmitter benutzen, sich jedoch funktionell sowie auch chemisch anhand ihres unterschiedlichen endogenen Peptidgehalts weiter differenzieren lassen (Hendry et al., 1984).

Bisher wurde angenommen, daß inhibitorische Interneurone ihren unterschiedlich stark ausgeprägten Einfluß vor allem dadurch erzielen, daß sie ihre Terminalen auf verschiedenen Kompartimenten des postsynaptischen Neurons plazieren, wie z.B. Axonhügel, Soma, proximale und distale Dendriten (LeVay, 1973). Vielleicht beruht dieses Phaenomen aber auch auf der Existenz verschiedener Klassen von GABA-Rezeptoren (Simmonds, 1983).

Desweiteren wäre denkbar, daß endogene Mediatoren, z.B. 'endogene Benzodiazepine' oder andere, noch nicht näher bekannte Substanzen die Wirkung von GABA bei Bedarf nach oben oder nach unten modulieren können, d.h., seinen inhibitorischen Einfluß entweder verstärken oder abschwächen.

Im Zusammenhang mit diesen Aspekten bedarf es einiger Zusatzerläuterungen über den bisher bekannten Wirkungsmechanismus von GABA bzw. den Aufbau seiner Rezeptoren, was im folgenden Kapitel abgehandelt werden soll.

3. Wirkungsmechanismus von GABA -

Aufbau und Funktion seiner Rezeptoren

3.1. GABA- Rezeptoren

Im Vertebraten-ZNS lassen sich zwei verschiedene GABA-Rezeptoren isolieren: GABA_A und GABA_B.

Obwohl deren chemische Struktur im einzelnen noch nicht bekannt ist, konnte vor allem der GABA_A-Rezeptor durch neuropharmakologische Untersuchungen mit agonistisch bzw. antagonistisch wirksamen Substanzen recht gut charakterisiert werden (Andrews und Johnston, 1979; Simmonds, 1983). Nach dem heutigen Wissensstand besteht der GABA_A-Rezeptorkomplex aus mindestens folgenden Bestandteilen:

1. Der spezifischen Bindungsstelle für GABA bzw. für direkte GABA-Mimetika, welche inhibitorische Transmittereigenschaften besitzen.
2. Einem wahrscheinlich in den Rezeptorkomplex integrierten Ionenkanal, welcher den Cl⁻-Ionenfluß kontrolliert.
3. Sogenannten 'regulatorischen Anheftungsstellen' (Simmonds, 1983) mit unterschiedlichen Affinitäten für exogene und endogene Mediatoren, welche durch Anlagerung an diese 'regulatorischen Bindungsstellen' die Wechselwirkung zwischen 1. und 2. massiv beeinflussen können.

So kann durch den Einfluß bestimmter Pharmaka die allosterische Konfiguration der spezifischen GABA-Bindungsstelle derart modifiziert werden, daß bei Anwesenheit agonistischer Wirkstoffe die Bindung von GABA erleichtert, bei Anwesenheit antagonistischer Wirkstoffe dagegen erschwert wird.

Für kein anderes Transmittersystem wurde bisher eine derartige Vielfalt an 'regulatorischen Bindungsstellen' beschrieben, welche sich weiterhin in 'high-affinity'- und 'low-affinity'-Bindungsstellen unterteilen lassen (Olsen, 1981).

Es wurden bereits mehrere Modellvorschläge für diesen GABA_A-Rezeptorkomplex entwickelt. Sie unterscheiden sich nur in Details, wie z.B. in der Lokalisation des Cl⁻-Kanals, haben jedoch alle die oben aufgeführten drei Hauptbausteine zum wesentlichen Bestandteil. Sowohl der GABA_A- als auch der GABA_B-Rezeptor sind bei entsprechender Aktivierung in der Lage, exzitatorische Erregungsausbreitung zu unterdrücken.

Die grundlegende Differenzierung dieser beiden Rezeptorenklassen erfolgte anhand der unterschiedlichen Reaktionsweisen gegenüber dem Einfluß bestimmter Pharmaka.

Über den GABA_B-Rezeptor ist noch sehr wenig bekannt. Er scheint nicht mit Cl⁻-Ionenkanälen assoziiert zu sein, sondern ist eher an der Modulation des Calcium-Ionenflusses mit beteiligt (1982; Dunlap, 1981).

Eine derartige Funktion könnte praesynaptisch inhibitorisch auf die Transmitterfreisetzung wirken.

Möglicherweise ist das proportionale Verhältnis dieser beiden Rezeptorentypen in einem bestimmten Areal ausschlaggebend für den Grad des inhibitorischen Einflusses, den GABA in diesem Gebiet auszuüben vermag (Simmonds, 1983).

3.2. Gabaerg kontrollierte Ionenkanäle

Die Chloridionenkanäle im ZNS von Vertebraten sind größtenteils eng mit dem GABA_A-Rezeptor assoziiert, welcher die Öffnung und Schließung dieser Kanäle kontrolliert (Nistri und Constanti, 1979).

Nach Aktivierung des GABA_A-Rezeptors wird eine Chloridionen-abhängige Hyperpolarisation des Membranpotentials beobachtet.

Weiterhin wurden Natrium-abhängige Depolarisationsvorgänge nach Aktivierung von GABA-Rezeptoren beschrieben (Nistri und Corradetti, 1978).

Das Mitwirken von Natrium in diesen Depolarisationsmechanismen hängt vermutlich eher mit der Aufrechterhaltung des angestrebten Chloridgradienten zusammen als mit der aktiven Integration von Natrium-Kanälen in diese Prozesse, und ist damit als Begleiterscheinung des Elektroneutralitätsprinzips zu interpretieren.

Schofield et al. (1987) beschreiben einen in das Rezeptormolekül integrierten Chloridionenkanal, welcher aus α - und β -Untereinheiten besteht.

Die α -Untereinheit repräsentiert dabei die eben beschriebene 'regulatorische Anheftungsstelle' für endogene und exogene Mediatoren, die β -Untereinheit die spezifische Bindungsstelle für GABA.

3.3. Agonisten und Antagonisten

Anlaß zur Differenzierung zwischen GABA_A und GABA_B-Rezeptoren war die unterschiedliche Reaktivität dieser Rezeptoren gegenüber dem Einfluß bestimmter Pharmaka (Simmonds, 1983).

So ist z.B. GABA die einzige Substanz mit agonistischer Wirkung auf beide Rezeptorenklassen. Desweiteren übt kein einziger, potentieller GABA_A-Antagonist einen pharmakologisch meßbaren Einfluß auf GABA_B-Rezeptoren aus (Bowery et al., 1983).

Baclofen (β -p-Chlorphenyl-GABA = Lioresal®) ist das bisher einzig bekannte Pharmakon mit einer GABA-mimetischen Wirkung auf GABA_B-Rezeptoren (Simmonds, 1983).

Es wird therapeutisch zur Behandlung zentral bedingter spastischer Erkrankungen eingesetzt (Faigle und Keberle, 1972).

Seine antispastischen Effekte beruhen dabei nicht auf dem klassischen GABA-mimetischen Wirkungsprinzip der postsynaptischen Hyperpolarisation, sondern vielmehr auf einer praesynaptischen Hemmung der exzitatorischen Transmitterfreisetzung im ZNS.

Außerdem soll es stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von GABA aus intrazellulären Speichern entfalten (Roberts et al., 1978).

Über die pharmakologischen Eigenschaften von GABA_B-Rezeptoren ist bisher leider genausowenig bekannt wie über deren chemische Struktur. Die im folgenden aufgeführten Pharmaka beziehen sich daher alle auf ihre Wirksamkeit gegenüber GABA_A-Rezeptoren.

3.3.1. Muscimol als selektiver GABA_A-Agonist

Als klassisches Toxin mit GABA_A-mimetischer Wirksamkeit ist Muscimol, das Gift des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*), bekannt. Das Isoxazolderivat wurde bereits von Johnston et al. (1968) als 'GABA-ähnliche Aminosäure' beschrieben und gilt als selektiver GABA-Agonist, was durch Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem GABA und Muscimol gezeigt werden konnte (Beaumont et al, 1978; Johnston et al., 1978).

Diesen Untersuchungen zufolge bindet Muscimol sogar mit noch höherer Affinität als GABA selbst an die entsprechenden Rezeptoren und lagert sich auch an dessen spezifische Bindungsstelle. Es hat jedoch nicht den geringsten Einfluß auf GABA_B-Rezeptoren (Bowery et al., 1983).

3.3.2. Bicucullin als selektiver GABA-Antagonist

Bicucullin - ein konvulsiv wirksames Alkaloid - wird zu den kompetitiven GABA-Antagonisten gerechnet, da es zusammen mit GABA und Muscimol dieselbe spezifische GABA-Bindungsstelle benutzt (Lister und Nutt, 1987).

Strukturelle Ähnlichkeiten des chemischen Aufbaus zwischen GABA, Muscimol und Bicucullin erklären dieses Phänomen.

Bicucullin-sensitive synaptische Hemmechanismen werden in zahlreichen Abschnitten des Säugergehirns gefunden (Andrews, 1979).

Die von Alger und Nicoll (1982) entwickelte Vorstellung von mehreren, sich strukturell unterscheidenden Bicucullin-sensitiven Rezeptoren wurde durch neuere Untersuchungen widerlegt (Simmonds, 1983).

3.3.3. Picrotoxin als nicht-kompetitiver GABA-Antagonist

Der zweite, klassische GABA-Antagonist ist ein nicht-kompetitiver Hemmer (Constanti, 1978; Nistri und Constanti, 1979; Simmonds, 1980), d.h., er greift nicht an der spezifischen GABA-Bindungsstelle an, sondern tritt wahrscheinlich mit den Chloridionenkanälen in direkte Wechselwirkung (Olsen et al, 1986).

Picrotoxin beeinflusst dabei nicht die individuelle Öffnungsdauer der einzelnen Chloridkanäle (Barker et al., 1981), sondern reduziert einfach deren Öffnungsfrequenz.

Durch allosterische Konfigurationsänderungen des Rezeptormoleküls wird die Bindung von GABA erschwert, was letztendlich eine Verminderung des 'Ionophor-Opening' zur Folge hat (Simmonds, 1983).

Weitere Antagonisten mit einem Picrotoxin-ähnlichen Wirkungsmechanismus sind 'Pentylentetrazol' (Simmonds, 1983) und die konvulsiv wirkenden Benzodiazepine 'Ro 5-3663' (Harrison und Simmonds, 1983) und 'Ro 15-4513', von welchem auch spezifische Ethanol-antagonistische Eigenschaften beschrieben sind. Es soll den durch Ethanol stimulierten 'uptake' von Chloridionen im ZNS antagonisieren (Suzdak et al., 1986).

Die analeptischen Eigenschaften von Substanzen mit GABA-antagonistischem Wirkungsprinzip sind schon lange bekannt (Werner, 1939; Hess, 1941; Hahn, 1960).

So wurden die Konvulsiva Pentylentetrazol und Picrotoxin sowohl therapeutisch als auch experimentell mit dem Ziel eingesetzt, die Wirkung zentral dämpfender Pharmaka wie die von Ethanol, Barbituraten oder Benzodiazepinen zu antagonisieren.

Diese - die GABA-Wirkung potenzierenden Substanzen - besetzen nämlich die regulatorischen Bindungsstellen am GABA-Rezeptor und haben somit Einfluß auf die Öffnung der Chloridionenkanäle.

Benzodiazepine scheinen dabei vor allem eine Frequenzsteigerung des 'Ionophor-Opening' zur Folge zu haben (Study und Barker, 1981). Sie wirken somit direkt antagonistisch zu Picrotoxin.

Auch Barbiturate potenzieren die inhibitorischen Einflüsse von GABA. Ihr Wirkungsmechanismus unterscheidet sich jedoch von dem der Benzodiazepine: sie verlängern nämlich die Öffnungsdauer der GABA-abhängigen Chloridkanäle (Study und Barker, 1981) und besetzen wahrscheinlich auch andere regulatorische Bindungsstellen als diese.

Auf diese Weise sind sie noch besser als die Benzodiazepine in der Lage, die durch GABA vermittelte Hemmung zu intensivieren (Polc et al., 1982).

Bestimmte Barbiturate, z.B: Phenobarbital, sind zudem in der Lage, die antagonistische Wirkung von Picrotoxin zu vermindern - und zwar in Konzentrationen, die keinen oder einen nur sehr unwesentlich potenzierenden Effekt auf GABA selbst ausüben (Simmonds, 1983).

Die direkt GABA-agonistischen Effekte hoher Barbituratkonzentrationen (Mathers und Barker, 1980) legen die Vermutung nahe, daß die Barbiturate mit dem GABA-Rezeptorkomplex auf verschiedene Weise in Wechselwirkung treten können.

Barbiturate erlangen ihre GABA-potenzierende Wirkung in erster Linie durch eine Verlängerung der Öffnungsdauer der Chloridkanäle, während Benzodiazepine eine Frequenzsteigerung des 'Ionophor-Opening' bewirken.

3.3.4. Endogene Inhibitoren

Im Zusammenhang mit den vielfältigen Angriffsstellen, die das GABA-Rezeptormolekül besitzt, gilt den 'endogenen Mediatoren' momentan großes Interesse.

Derartige Mediatoren sind entweder in den Nervenzellmembranen inkorporiert oder werden in intrazellulären Depots gespeichert und bei Bedarf freigesetzt. Sie sind in der Lage, die Affinitäten der spezifischen GABA-Bindungsstelle bzw. die der regulatorischen Bindungsstellen zu modulieren.

So können derartige Substanzen entscheidenden Einfluß auf die Wirkungsweise von GABA bzw. dessen Mimetika oder Antagonisten ausüben.

Über die Identität dieser endogenen Inhibitoren ist noch nicht sehr viel bekannt, nur wenige konnten bisher genauer charakterisiert werden (Andrews, 1979).

Eine endogene, GABA-antagonistisch wirksame Substanz scheint mit 'Phosphatidylamin' eng assoziiert zu sein (Johnston und Kennedy, 1978). Ihr Wirkungsprinzip beruht auf

einer nicht-kompetitiven Maskierung der 'high-affinity-Bindungsstelle' für GABA.

Ein weiterer endogener GABA-Antagonist liegt an ein saures Protein gekoppelt vor und soll sowohl die Affinität als auch Anzahl der in einem bestimmten Areal verfügbaren GABA-Bindungsstellen beeinflussen können (Toffano et al., 1978; Guidotti et al., 1978).

Dieser endogene Wirkstoff hemmt auch die Anlagerung von Benzodiazepinen und er kann durch die Applikation von Diazepam von den Nervenzellmembranen verdrängt werden (Guidotti et al., 1978). Aus dieser Beobachtung heraus wird die Möglichkeit diskutiert, daß Benzodiazepine ihre GABA-potenzierende Wirkung vor allem dadurch entfalten, daß sie diesen endogenen Mediator von seiner Bindungsstelle am GABA-Rezeptorkomplex kompetitiv antagonisieren.

Durch Untersuchungen am Corpus striatum von Ratten konnte gezeigt werden, daß die chronische Zufuhr von Diazepam oder Phenobarbital eine quantitative Zunahme der GABA-Rezeptoren zur Folge hat (Möhler et al., 1978).

Derartige Pharmaka haben also auch einen stimulierenden Effekte auf die Verteilung von GABA-Rezeptoren in einem bestimmten Areal.

Zusammengefaßt kann festgehalten werden, daß die Existenz sogenannter 'endogener Inhibitoren' zwar nachgewiesen ist, über deren Identität sowie funktionelle Wirkungsmechanismen noch recht wenig bekannt ist.

Es darf jedoch angenommen werden, daß ihr Einfluß auf GABA-spezifische Rezeptoren sehr viel größer ist als bisher vermutet.

Die Komplexität des oben beschriebenen Rezeptorenaufbaus und die vielfältigen Einflüsse, die sowohl exogene als auch endogene Wirkstoffe an diesen Rezeptoren entfalten können, zeigt, daß der morphologische Nachweis GABA-positiver Strukturen in einem bestimmten Areal nur eingeschränkte Aussagekraft besitzt, insbesondere dann, wenn man neuropharmakologische Einflüsse nicht mit in Betracht zieht.

4. Neuropharmakologie

Zahlreiche neuropharmakologische Arbeiten mit spezifisch anta- bzw. agonistisch wirksamen Pharmaka haben Aufschluß über die quantitative sowie auch qualitative Beteiligung von GABA am funktionellen Aufbau neuronaler Systeme geben können.

Durch neuropharmakologische Untersuchungen im visuellen Cortex wurde gezeigt, daß dort hauptsächlich GABA als inhibitorischer Transmitter wirksam ist (Iversen et al., 1971).

So läßt sich die Richtungsspezifität von 'simple-Zellen' im visuellen Cortex adulter Tiere durch iontophoretische Applikation des GABA-Antagonisten Bicucullin erniedrigen bzw. vollkommen eliminieren (Sillito, 1975, 1977, 1979; Tsumoto et al, 1979; Burchfield und Duffy, 1981). Ähnliche Untersuchungen von Sato und Tsumoto (1984) und Wolf et al. (1986) am neonatalen Cortex bestätigen diese Befunde.

Intracorticale gabaerge Interneurone werden - gestützt durch immunocytochemische und elektronenmikroskopische Arbeiten (Hendrickson et al., 1981; Hendry und Jones, 1981; Ribak, 1978) für das richtungsspezifische Antwortverhalten dieser Zellpopulation verantwortlich gemacht, wobei die Terminalen solcher inhibitorischen Interneurone in erster Linie auf den Zellsomata, dem Axonhügel, und den proximalen Dendriten der entsprechenden Output-Neurone lokalisiert sind (LeVay, 1973).

Montero und Zempel (1986) beschreiben gabaerge Neurone im Corpus geniculatum laterale (LG) beim Affen, welche sehr wahrscheinlich inhibitorische Interneurone repräsentieren (Dubin und Cleland, 1977; Lindström, 1982) und so an der Ausbildung bestimmter rezeptiver Feldeigenschaften der Geniculatum-'Output-Neurone' beteiligt sind.

Auch richtungsspezifische retinale Ganglienzellen verlieren nach einer iontophoretischen Applikation von

Bicucullin bzw. Picrotoxin diese Eigenschaft (Caldwell et al., 1978).

Das richtungsspezifische Antwortverhalten von Neuronen im Colliculus superior läßt sich durch Bicucullin in vielen Fällen reduzieren (Hofstetter, 1987; pers. Mitteilung).

An NOT-Projektionsneuronen konnte dagegen kein signifikanter Einfluß von Bicucullin auf das richtungsspezifische Antwortverhalten festgestellt werden. Allenfalls eine unspezifischer, aktivitätsmindernder Effekt war zu beobachten.

Im Rahmen dieser Studien konnten die in der Einleitung angesprochenen 'Jerk-Neurone' deutlicher beeinflusst werden.

So ließen sich ihre maximalen Entladungsraten, die sogenannten 'bursts' mit GABA bzw. seinem selektiven Agonisten Muscimol in vielen Fällen erniedrigen. Dieser Effekt konnte mit Bicucullin wieder antagonisiert werden. Der Einfluß auf ihre spontane Entladungsrate scheint jedoch sehr viel geringer zu sein.

Anhand der Ergebnisse meiner Untersuchungen können folgende Überlegungen angestellt werden:

Die NOT-Projektionsneurone zur dorsalen Kappe der Oliva inferior erhalten zwar gabaergen Eingang, welcher sich jedoch im Vergleich zu den Verhältnissen bei tiefen Colliculusneuronen und anderen, nicht retrograd markierten NOT-Neuronen, minimal gestaltet. Es scheint deshalb unwahrscheinlich, daß die wenigen GABA-positiven Terminalen an NOT-Projektionsneuronen dazu in der Lage sind, so komplexe Antworteigenschaften wie die Richtungsspezifität unter Kontrolle zu halten - insbesondere dann, wenn man die hier vorliegenden Verhältnisse mit Systemen vergleicht, die einen zur Erzeugung ihres richtungsspezifischen Antwortverhaltens sehr starken gabaergen Eingang benötigen (s.u.).

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (Lu et al., 1985; Horn und Hoffmann, 1987) konnte ich einen starken

gabaergen Besatz der Neurone im SGI des Colliculus superior nachweisen.

Die Applikation der GABA-Antagonisten Picrotoxin oder Bicucullin führt zumindest zu einer Reduktion der für diese Neuronenpopulation charakteristischen 'Umfeldhemmung' (Hofstetter, 1987; pers. Mitteilung).

In diesem Zusammenhang möchte ich darauf aufmerksam machen, daß ich im Rahmen meiner Arbeit nur den Nachweis für eine direkte, räumliche Lokalisation von GABA-positiven 'Punkten' am Soma bzw. an proximalen Dendriten bestimmter Neurone erbracht habe - der eindeutige Beweis für einen direkten synaptischen Kontakt muß durch Untersuchungen am Elektronenmikroskop erfolgen.

Die lichtoptische Darstellung GABA-positiver Terminalen darf jedoch durchaus als Hinweis für einen gabaergen Eingang auf das betreffende Neuron gewertet werden, da in elektronenmikroskopischen Studien die meisten dieser 'Punkte' als axosomatische bzw. axodendritische Synapsen identifiziert werden konnten (Ribak et al., 1981).

Die in meinen Untersuchungen immer als 'nicht retrograd markierte NOT-Neurone' bezeichneten Nervenzellen zeigen bezüglich ihres Besatzes mit gabaergen Terminalen große Ähnlichkeit mit den tiefen Colliculusneuronen.

Möglicherweise handelt es sich bei dieser Neuronenpopulation um die eingangs beschriebenen 'Jerk-Neurone' (s. Einleitung). Diese Vermutung wird durch neuropharmakologische Beobachtungen unterstützt:

Durch die lokale Applikation von Bicucullin lassen sich beide Neuronenpopulationen in ihrem Antwortverhalten deutlich beeinflussen: während bei den Colliculusneuronen

die Richtungsspezifität beeinträchtigt wird, potenziert Bicucullin die möglicherweise unter gabaerger Kontrolle stehende 'burst-Aktivität' der Jerk-Neurone, welche durch GABA bzw. Muscimol gehemmt werden kann.

Diese Vorstellung könnte den starken gabaergen Besatz dieser Neuronenpopulationen erklären, der sich in meinen Bildern nachweisen läßt.

Ballas et al. (1981) beschreiben diese Neurone zwar etwas tiefer im Praetectum gelegen als die NOT-Projektionsneurone - neuere Untersuchungen postulieren jedoch eine diffuse Verteilung dieser Neuronenpopulation übers gesamte Praetectum (Schweigart, 1987; pers. Mitteilung) - also keine anatomisch abgrenzbare 'Kernformation'.

Die Jerk-Neurone reagieren meist richtungsunspezifisch auf sehr schnell bewegte Reizmuster, welche dem Geschwindigkeitsbereich der schnellen Rückstellsakkaden des OKN entsprechen. Sie erhalten direkten retinalen Eingang von schnell leitenden Y-Fasern (Ballas und Hoffmann, 1985), ihre Zellmorphologie sowie ihre efferenten Verbindungen sind jedoch ungeklärt.

Aus diesem Grunde ist eine selektive Darstellung durch retrograde Markierung dieser Zellen nicht möglich und die Annahme, daß es sich bei diesen 'nicht retrograd markierten NOT-Neuronen' um die physiologisch gut charakterisierten Jerk-Neurone handeln könnte, bleibt bis zum Gelingen einer einwandfreien Identifizierung dieser Zellen im histologischen Bild hypothetisch.

Bezugnehmend auf die in der Fragestellung angesprochenen Punkte können anhand meiner Ergebnisse folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die von der Oliva inferior her retrograd markierten NOT-Neurone werden von einer relativ geringen Anzahl GABA-positiver Terminalen kontaktiert, wobei der

Terminalenbesatz an deren proximalen Dendriten deutlich höher ist als an den entsprechenden Somata.

Die enge räumliche Lokalisation dieser Terminalen an den NOT-Projektionsneuronen durch die Darstellung an 1µm dünnen Schnitten darf als Hinweis auf die Existenz direkter synaptischer Kontakte gewertet werden, wobei der exakte Nachweis für monosynaptische Eingänge am Elektronenmikroskop erbracht werden muß.

2. Im Vergleich zu den Verhältnissen bei den tiefen Colliculusneuronen gestaltet sich der gabaerge Einfluß auf NOT-Projektionsneurone sehr bescheiden.

Diese Beobachtung wird durch neuropharmakologische Untersuchungen gestützt, in denen gezeigt werden konnte, daß GABA keine dominierende Rolle beim Zustandekommen des richtungsspezifischen Antwortverhaltens von NOT-Zellen spielt, wohingegen die charakteristischen Antworteigenschaften bestimmter Colliculusneurone massiv gabaerg beeinflußt werden.

3. Analysiert man andere Neuronenpopulationen des NOT, so findet man praetectale Neurone, welche das NOT-Gebiet in diffuser Verteilung durchsetzen, von der Oliva inferior her jedoch nicht retrograd markiert werden.

Auffälligstes Merkmal dieser Neuronenpopulation ist ihr massiver - den tiefen Colliculusneuronen vergleichbarer Besatz mit GABA-positiven Terminalen.

In Anlehnung an neuropharmakologische Studien wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß es sich bei diesen Zellen um die bisher nur in elektrophysiologischen Studien charakterisierten Jerk-Neurone handeln könnte.

5. Inhibitorische Interneurone im NOT - ein Funktionsmodell

Der Nachweis GABA-positiver Neurone im NOT wurde bereits von mehreren Autoren erbracht (Weber und Chen, 1984; Giolli et al., 1985; Mugnaini und Oertel, 1985; Horn und Hoffmann, 1987).

Auch die Ergebnisse meiner Arbeit geben letztendlich keinen eindeutigen Aufschluß darüber, ob diese GABA-positiven Neurone hemmende Interneurone repräsentieren, deren Terminalen vielleicht auf den putativen Jerk-Neuronen und zu einem geringen Prozentsatz auch auf den NOT-Output-Neuronen enden, oder ob es sich um in andere Areale ausstrahlende Projektionsneurone handelt. Eine Möglichkeit schließt dabei die andere nicht aus.

Die anatomische Zuordnung GABA-positiver Terminalen zu den entsprechenden Somata war aus methodischen Gründen nicht möglich, da immer nur die proximalen Fragmente eines Axonverlaufs verfolgt werden konnten.

Auch die Morphologie der GABA-positiven Zellen liefert kein eindeutiges Kriterium für eine sichere Aussage - obwohl die geringere Größe der gabaergen Neurone als Hinweis auf ihre Funktion als Interneurone gewertet werden darf (Ribak et al., 1981; Oertel et al., 1982; Wu et al., 1982).

In Anlehnung an die Ergebnisse meiner Untersuchungen kann festgehalten werden, daß die relativ hohe Dichte GABA-positiver Terminalen um die Somata und proximalen Dendriten der putativen Jerk-Neurone und der schwache Besatz von NOT-Projektionsneuronen auf die Existenz gabaerger Interneurone im NOT hindeutet, wobei deren gleichzeitige Funktion als Projektionsneurone in extrinsische Areale nicht ausgeschlossen werden kann.

Ein Zusammenspiel von Jerk-Neuronen und NOT-Projektionsneuronen in Form eines direkten inhibitorischen

Einflusses wird diskutiert (Horn und Hoffmann, 1987). Danach sollen NOT-Neurone während der schnellen Rückstellsakkaden des OKN durch Jerk-Neurone über Vorwärtshemmung inhibiert werden, um so zu verhindern, daß die schnellen Rückstellsakkaden des OKN ihrerseits wieder ein Augenbewegungssignal provozieren. Eine derartige Wechselwirkung könnte auch die enge räumliche Beziehung zwischen 'Jerk-Neuronen' und NOT-Projektionsneuronen erklären.

Die Funktion gabaerger Interneurone im NOT könnte folgendermaßen erklärt werden:

Ausgehend von der Annahme, daß die in meinen Untersuchungen nachgewiesenen GABA-positiven Terminalen auf den Somata und proximalen Dendriten der putativen 'Jerk-Neurone' diesen inhibitorischen Interneuronen zuzuordnen sind, könnte während der langsamen Folgephase des OKN die burst-Aktivität der 'Jerker' durch diese Interneurone unterdrückt werden.

Durch eine praesakkadische oder ein gleichzeitig mit einer sakkadischen Augenbewegung eintretende Aktivitätsabsenkung dieser Interneurone kommt es zu einem Nachlassen des inhibitorischen Einflusses auf die von schnellen γ -Fasern (50m/s) getriebenen Jerk-Neurone, wodurch die hohen Entladungsraten dieser Jerk-Neurone während der schnellen Rückstellsakkaden des OKN überhaupt erst ermöglicht werden.

Mit Beginn der nächsten, langsamen Folgephase steigt nun die Aktivität der inhibitorischen Interneurone und damit ihr hemmender Einfluß auf die Jerk-Neurone an, was dort wiederum ein Absinken der Aktivitäten nach sich zieht.

Die Aktivitätsabsenkung der Interneurone kurz vor und während einer sakkadischen Augenbewegung könnte durch einen an die Rückstellsakkade gekoppelten, verminderten exzitatorischen Eingang auf diese Interneurone erklärt werden. Es wäre jedoch auch möglich, daß die Interneurone ihrerseits während diesem Zeitraum inhibitorischen Einfluß erhalten. Wo dieser, die Aktivität der Interneurone beeinflussende Mechanismus letztendlich lokalisiert ist, kann im Rahmen meiner

Untersuchungen nicht weiter verfolgt werden.

Mit diesem Modell wäre ein kontrolliertes - mit den schnellen Rückstellsakkaden des OKN korreliertes - An- und Abschalten der 'Jerk-Neuronen-Aktivität' denkbar.

Während der Phase der schnellen Rückstellsakkade könnten nun die NOT-Projektionsneurone von den Jerk-Neuronen durch ein zwischengeschaltetes Interneuron - also über Vorwärtshemmung - inhibitorischen Einfluß erhalten, über den dann eine gleichzeitige Aktivierung der NOT-Neurone durch die schnelle Rückstellsakkade verhindert und das Auslösen einer konjugierten Augenbewegung unterbunden wird.

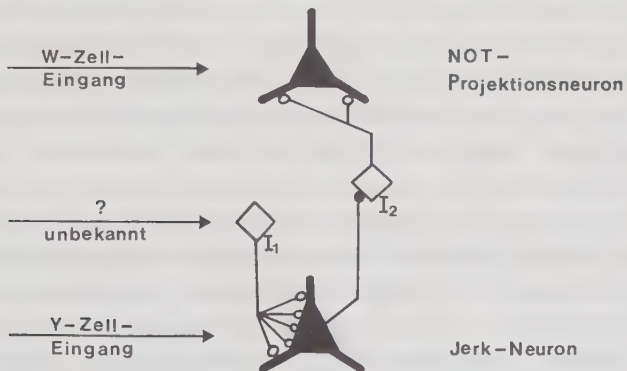


Abb. 27: Funktionsmodell inhibitorischer Interneurone im Praetectum: Eine Aktivitätsabsenkung der Interneurone (I_1) kurz vor und während einer sakkadischen Augenbewegung ermöglicht maximale Entladungsraten der von schnellen Y-Fasern getriebenen Jerk-Neurone. Durch ein zwischengeschaltetes Interneuron (I_2) auf NOT-Projektionsneurone wird das Auslösen einer konjugierten Augenbewegung während der schnellen Rückstellsakkade unterbunden. Dieses Modell postuliert zwei verschiedenartig aktivierte Interneurone: I_1 ist während der langsamen Folgephase aktiviert, I_2 während der schnellen Rückstellsakkade. (—○ = inhibitorische Synapse; —● = exzitatorische Synapse).

Über die Funktion inhibitorischer Synapsen auf NOT-Neuronen lassen sich in Anlehnung an andere Arbeiten weitere Möglichkeiten diskutieren:

Maekawa und Simpson (1972; 1973) beschreiben eine Hemmung der vom NOT absteigenden Bahnen in die Oliva inferior als Folge einer elektrischen Reizung im medialen terminalen Nucleus (MTN).

Der MTN ist Bestandteil des 'akzessorischen optischen Systems' (AOS), dessen Kerne mit den richtungsspezifischen NOT-Neuronen funktionell eng verknüpft sind.

Es repräsentiert ebenfalls eine wichtige Schaltstelle im afferenten Schenkel des optokinetischen Reflexbogens.

Es besteht aus drei Kernen, welche über den sogenannten 'akzessorischen optischen Trakt' (AOT) in erster Linie vom kontralateralen Auge innerviert werden (Hayhow et al., 1960): dem dorsalen terminalen Nucleus (DTN), dem medialen terminalen Nucleus (MTN) und dem lateralen terminalen Nucleus (LTN).

Ihre Neurone antworten ebenfalls richtungsspezifisch auf langsam bewegte, kontrastreiche Muster, jedoch mit unterschiedlichen Vorzugsrichtungen in den drei Kernen (Simpson et al., 1979; Grasse und Cynader, 1982; 1984).

Neben einer Verbindung vom NOT zum MTN (Tupaja: Weber und Harting, 1980; Kaninchen: Holstege und Collewyn, 1982) existiert eine reziproke Projektion des MTN zum ipsilateralen NOT und DTN (Ratte: Blanks et al, 1982; Kaninchen: Simpson und Soodak, 1978; Katze: Berson und Graybiel, 1980).

Giolli et al. (1985) diskutieren die Möglichkeit, daß der inhibitorische Einfluß der vom NOT und DTN absteigenden Bahnen nach Reizung im MTN auf eine direkte gabaerge Projektion vom MTN zum NOT zurückzuführen ist.

Inhibition der 'NOT-Output-Neurone' könnte jedoch auch durch die Zwischenschaltung lokaler Interneurone, welche von exzitatorischen Fasern des MTN getrieben werden (also über Vorwärtshemmung), zustande kommen.

Weiterhin wäre denkbar, daß hemmende Interneurone im NOT von absteigenden corticalen Bahnen aktiviert werden um dort dann lokale, inhibitorische Funktionen zu übernehmen.

Daß diese corticalen Projektionen dann aber nicht ursächlich mit dem richtungsspezifischen Antwortverhalten der NOT-Neurone in Zusammenhang gebracht werden können, beweisen Läsionsexperimente am visuellen Cortex, welche keinen Ausfall der Richtungsspezifität von NOT-Neuronen zur Folge haben.

Letztendlich geben die aufgeführten Überlegungen keinen eindeutigen Aufschluß darüber, ob die GABA-positiven Neurone des NOT als Interneurone und/oder als Projektionsneurone aufzufassen sind.

Festzuhalten bleibt jedoch, daß diese Neurone für lokale, inhibitorische Funktionen durchaus in Frage kommen, wobei ihr hemmender Einfluß vor allem aber mit der kontrollierten, an schnelle Reizgeschwindigkeiten gekoppelten Aktivität der putativen 'Jerk-Neurone' in Zusammenhang gebracht werden kann, welche ihrerseits vielleicht über gabaerge Interneurone mit den NOT-Projektionsneuronen in Wechselwirkung treten.

Daß dieser inhibitorische Einfluß dann allenfalls modulatorischen Charakter besitzen kann und keinen maßgeblichen Einfluß auf die Richtungsspezifität ausübt, zeigen Vergleiche mit großen Colliculusneuronen, die zur Aufrechterhaltung ihres richtungsspezifischen Antwortverhaltens einen massiven Besatz GABA-positiver Terminalen benötigen.

Eine derartige, rein 'modulatorische Funktion', könnte die Anwesenheit einer relativ geringen Anzahl GABA-positiver Terminalen an den NOT-Projektionsneuronen erklären.

Ob diese Terminalen an den Somata und proximalen Dendriten der NOT-Neurone tatsächlich von inhibitorischen Interneuronen stammen oder ob sie von extrinsischen Arealen her projizieren, konnte durch meine Untersuchungen nicht gezeigt werden.

Abschließend können folgende Aussagen getroffen werden:

Die NOT-Projektionsneurone erhalten schwachen inhibitorischen Eingang, welcher durch einen geringen gabaergen Besatz dieser Neuronenpopulation repräsentiert wird.

Die GABA-positiven 'Punkte' kontaktieren dabei vor allem die proximalen Dendriten der NOT-Zellen, weniger deren Somata.

Sie sind am Zustandekommen des richtungsspezifischen Antwortverhaltens nicht wesentlich beteiligt, sondern übernehmen andere - wahrscheinlich nur modulatorische Aufgaben. Diese könnten mit regulierenden Einflüssen auf die Entladungsrates der NOT-Output-Neurone - letztendlich also mit der 'Gain-Regulation' (s. Einleitung) - in ursächlichen Zusammenhang gebracht werden.

6. Richtungsspezifität

6.1. Richtungsspezifitätsmodelle

Der Mechanismus, welcher das Zustandekommen charakteristischer Antworteigenschaften wie die der Richtungs- oder Orientierungsspezifität bestimmter Neuronenpopulationen bewerkstelligt, war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Wie bereits erwähnt, führt lokale iontophoretische Applikation des GABA-Antagonisten Bicucullin auf 'simple-Zellen' im visuellen Cortex, die ihrerseits richtungsunspezifischen Eingang von Geniculatumneuronen erhalten, zu einer signifikanten Reduktion oder völligen Eliminierung der Richtungsspezifität (Sillito, 1975; 1977). Analog zu diesen Beobachtungen konnte die Orientierungsspezifität von Pyramidenzellen mit komplexen rezeptiven

Feldern im visuellen Cortex mit Bicucullin erniedrigt bzw. ganz beseitigt werden (Sillito, 1975; 1979).

Laterale Hemmechanismen oder die Existenz von rekurrierenden Kollateralen von Komplexzellen auf inhibitorische Interneurone (negativer 'feed-back') werden für das orientierungsspezifische Antwortverhalten dieser Neuronenklasse verantwortlich gemacht.

Diese Befunde demonstrieren gut, daß GABA in vielen Fällen auf die Ausbildung charakteristischer rezeptiver Feldeigenschaften bestimmter Neuronenpopulationen maßgeblichen Einfluß hat.

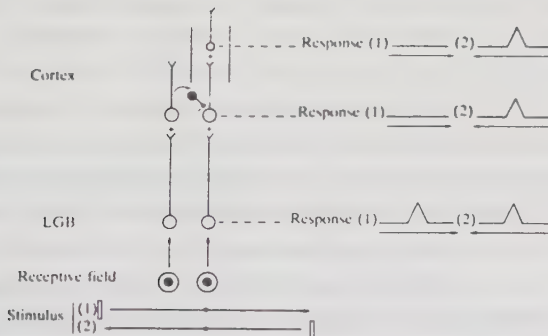


Abb. 28: Schema eines inhibitorischen Schaltkreises zur Erzeugung von Richtungsspezifität an 'simple'-Zellen im visuellen Cortex (nach Sillito, 1979).

Ein derartiges Modell kann jedoch aus eben diskutierten Gründen als alleinige Erklärung für das Zustandekommen des richtungsspezifischen Antwortverhaltens der NOT-Neurone nicht herangezogen werden.

Versuche, das richtungsspezifische Antwortverhalten bestimmter Neuronenpopulationen quantitativ zu erklären, reichen bis in die sechziger Jahre zurück.

Schon Barlow und Levick (1965), entdeckten in der Retina von Kaninchen richtungsspezifische Ganglienzellen, die durch Bewegung in Vorzugsrichtung aktiviert wurden, nicht jedoch durch Bewegung in Nullrichtung.

Sie folgerten daraus, daß diese Zellen ihre Richtungsselektivität durch eine Art 'Veto-Operation' erhalten, d.h., die Zelle reagiert auf einen Bewegungsreiz aus der Nullrichtung nicht etwa deshalb schwach, weil sie zu wenig empfindlich wäre, sondern weil eine erregende Antwort aktiv inhibiert wird.

Sie entwickelten daraus folgendes Modell für die retinale Bewegungsreaktion:

Die mit richtungsspezifischen Zellen verbundenen Photorezeptoren sind so angeordnet, daß der sich in Vorzugsrichtung bewegend Reiz erst exzitatorische, dann inhibitorische Zellen aktiviert - die inhibitorischen Impulse also erst nach den exzitatorischen ankommen.

Durch diesen Zeitverzug sind - bei Bewegung in Vorzugsrichtung - hemmende Signale langsamer als erregende.

Diese verzögerten inhibitorischen Signale sind nun nicht mehr in der Lage, die exzitatorischen Impulse abzufangen.

Bewegt sich der visuelle Stimulus dagegen in Nullrichtung, werden zuerst inhibitorische Impulse ausgelöst. Diese werden nun von den schnelleren, exzitatorischen eingeholt - sie löschen sich beim Zusammentreffen gegenseitig aus.

Dieses Modell veranschaulicht gut, warum Lichtreize stärker erregen, wenn sie beide Photorezeptortypen gleichzeitig und nicht erst den inhibitorischen (bei Bewegung in Nullrichtung) aktivieren.

1978 schlugen Torre und Poggio einen weiteren Typ von Mechanismus vor, der für den 'Veto-Effekt' bei der Bewegungsdetektion verantwortlich sein könnte.

Er beruht auf einem besonderen Typ von Hemmung: 'stille Hemmung' bzw. 'silent inhibition' - bisweilen auch als 'shunting inhibition' (Kurzschluß) bezeichnet.

Am Beispiel von Chlorid kann das Funktionsprinzip erklärt werden, obwohl es wahrscheinlich nicht das einzige beteiligte Ion ist.

Chlorid ist außerhalb der Zelle höher konzentriert als innen. Der Potentialgradient bewirkt, daß die negativ geladenen Ionen während des Ruhezustandes nicht in das Zellinnere gelangen. Konzentrations- und Potentialgradient gleichen einander aus, sodaß nichts geschieht, wenn eine still hemmende Synapse die Chloridkanäle öffnet. Das Chloridionengleichgewicht wird nicht neu eingestellt und das Ruhepotential kaum verändert.

Wird nun eine still inhibitorische Synapse gleichzeitig mit einer erregenden aktiviert, depolarisiert der plötzliche Einstrom von Natrium die Zelle und stört das Gleichgewicht der beiden Gradienten.

Dadurch wird der Potentialgradient abgebaut und es kommt zu einem Einstrom von Chloridionen, der der depolarisierenden Wirkung der Natriumionen entgegengerichtet ist. Es kann lediglich eine leichte Depolarisation erfolgen.

Wenn nicht zufällig ein hemmendes Signal mit einem erregenden zusammentrifft, läßt es sich auch nicht am Nervenmembranpotential feststellen - daher auch die Bezeichnung 'stille Hemmung', sie wird erst durch Erregung sichtbar.

In Anlehnung an das Modell von Barlow und Levick können exzitatorische und inhibitorische Signale nur dann zusammentreffen, wenn sie durch Bewegung in Nullrichtung ausgelöst werden.

Aus diesem Modell resultiert, daß eine still hemmende Synapse am besten entweder an der Position einer exzitatorischen Synapse, oder irgendwo zwischen ihr und dem Nervenzellkörper liegt.

Daher funktioniert das Modell bereits bei wenigen Synapsen und einem kleinen Stück dendritischer Membran. Die beiden Signale interagieren, bevor sie den Zellkörper erreichen und können so ihren Veto-Effekt an vielen verschiedenen Stellen der betreffenden Neurone entfalten.

Mit diesem Modell ist auch erklärbar, daß Erregung und stille Hemmung auf den Dendriten eines bestimmten Neurons wechselwirken können, bevor sie das Soma erreichen.

Bei Nervenzellen mit hochgradig verzweigten Dendriten - wie bei retinalen Ganglienzellen - vergrößert sich die Zahl der Stellen, an denen synaptische Interaktionen wirksam werden, erheblich.

Dieses - mit dem richtungsspezifischen Antwortverhalten bestimmter Neuronentypen korrelierte Modell still hemmender Synapsen, läßt sich - mit gewissen Vorbehalten - sehr gut auf die NOT-Projektionsneurone übertragen, wobei der vorherrschende Einfluß auf deren Richtungsspezifität jedoch in Frage gestellt werden muß.

Durch meine Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die NOT-Projektionsneurone von relativ wenigen GABA-positiven Terminalen kontaktiert werden und diese in erster Linie auf den Dendriten dieser Nervenzellen lokalisiert sind.

Im Rahmen meiner Studien konnten jedoch immer nur die proximalen Abschnitte eines Zellausläufers auf ihren Terminalenbesatz analysiert werden, die Untersuchung von distaleren Abschnitten oder die Verfolgung eines Dendriten über seine gesamte Länge hinweg war aus methodischen Gründen nicht möglich (s.2.2.).

Detailliertere Untersuchungen des Terminalenbesatzes und der Dendritenverzweigung von NOT-Projektionsneuronen am Elektronenmikroskop könnten in diesem Zusammenhang weiteren Aufschluß bringen.

Das eben beschriebene Modell könnte die Funktion dieser Terminalen als 'still hemmende Synapsen' veranschaulichen, welche vielleicht auf diese Weise modulatorischen Einfluß auf die Entladungsrate der NOT-Zellen ausüben.

Diese 'silent-inhibition-Synapsen' verhindern möglicherweise eine Hyperaktivierung der NOT-Zellen, wenn diese gleichzeitig von corticalen und/oder retinalen Afferenzen aktiviert werden. Sie könnten an der stabilen Aufrechterhaltung einer für die langsame Folgephase des OKN relevanten Entladungsrate mitwirken, indem sie die Aktivität der NOT-Output-Neurone je nach Intensität des exzitatorischen Eingangs nach oben bzw. nach unten modulieren.

Durch bisherige Untersuchungen konnte nicht gezeigt werden, wo der Mechanismus lokalisiert ist, der das Zustandekommen der Richtungsspezifität der NOT-Zellen bewerkstelligt.

Das Absinken der Spontanaktivität im NOT bei Katzen und Affen bei Bewegung des Reizmusters in Nullrichtung erfordert entweder die Anwesenheit lokaler inhibitorischer Schaltmechanismen, welche in ausreichender Dichte und funktionsgerechter Lokalisation die entsprechenden Zellen besetzen und aus den vielfältigen exzitatorischen Eingängen nur die der bevorzugten Richtung 'herausfiltern'- oder, es sind genügend richtungsspezifische Eingänge vorgeschaltet, welche dann den Einfluß lokaler inhibitorischer Interneurone für das Erzeugen des richtungsspezifischen Verhaltens überflüssig machen. Die Aktivitätsabsenkung bei Bewegung in Nullrichtung könnte dann durch einen verminderten corticalen und/oder retinalen Eingang richtungsspezifischer Zellen bewerkstelligt werden.

Die Richtungsspezifität von NOT-Neuronen scheint nicht - zumindest nicht bei langsamen Reizstimuli - unter corticaler Kontrolle zu stehen.

Dies beweisen Läsionsexperimente am visuellen Cortex, welche zwar einen Verlust der binokularen Erregbarkeit und der Fähigkeit, auf schnelle Reizstimuli zu reagieren, nach sich ziehen, jedoch keinen Einfluß auf das richtungsspezifische Antwortverhalten der NOT-Neurone entfalten (Hoffmann, 1981).

Bei Colliculusneuronen dagegen tritt nach dem gleichen Eingriff eine Verschlechterung des richtungsspezifischen Antwortverhaltens auf (Wickelgreen und Sterling, 1969; Rosenquist und Palmer, 1971).

Daraus ist zu folgern, daß der richtungsspezifische Mechanismus entweder in retinalen oder in anderen - noch nicht näher analysierten subcorticalen Strukturen seinen Ursprung haben muß.

Die Existenz richtungsspezifischer retinaler Ganglienzellen stützt die Hypothese, daß die Richtungsspezifität bereits durch retinale Afferenzen codiert wird. Dagegen spricht die äußerst kleine Population retinaler Ganglienzellen (1% bei der Katze; s. Einleitung), welche zum NOT projizieren und der Tatbestand, daß nicht nur horizontale Bewegungen codiert werden (Hoffmann und Stone, 1985).

Wo dieser Mechanismus letztendlich lokalisiert ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Durch die Ergebnisse meiner Arbeit wird die Hypothese widerlegt, daß die Richtungsspezifität der NOT-Neurone das Ergebnis lokaler, inhibitorischer Verschaltungen darstellt.

E Zusammenfassung

Das Verteilungsmuster gabaerger Terminalen um Neuronenpopulationen im NOT bzw. Colliculus superior der Katze wurde quantitativ untersucht.

Richtungsspezifische Projektionsneurone und tiefe Colliculusneurone wurden durch retrograden MRP-Transport von der Oliva inferior aus markiert.

Der Nachweis GABA-positiver Zellstrukturen erfolgte immunocytochemisch nach der 'Post-Embedding-Methode' an Semidünnschnitten.

Durch Anwendung einer modifizierten Doppelmarkierungsmethode gelang die gleichzeitige Darstellung retrograd markierter Neurone und GABA-immunreaktiver Zellelemente in einem histologischen Bild.

Es konnte gezeigt werden, daß die Somata der richtungsspezifischen NOT-Projektionsneurone einen sehr geringen gabaergen Terminalenbesatz (0.357 Terminalen/ $100\mu\text{m}$ Zellmembran) aufweisen.

Sie sind von einer lichtoptisch als 'heller Hof' in Erscheinung tretenden $5\mu\text{m}$ breiten Zone umgeben, die signifikant weniger GABA-positive Terminalen (0.622 Terminalen/ $100\mu\text{m}^2$) enthält als eine Vergleichszone im Abstand von $5-10\mu\text{m}$ von der Zellmembran (2.628 Terminalen/ $100\mu\text{m}^2$).

Bei den proximalen Dendriten der Projektionsneurone tritt dieser signifikante Unterschied jedoch nur in 50% der Fälle auf (Fläche x : 1.263 Terminalen/ $100\mu\text{m}^2$; Fläche a : 2.42 Terminalen/ $100\mu\text{m}^2$) und ihr Besatz mit direkt kontaktierenden Terminalen liegt - im Vergleich zu den Somata - um das Dreifache höher (1.106 Terminalen/ $100\mu\text{m}$ Dendritenmembran).

Im Gegensatz dazu konnte ein massiver gabaerger Terminalenbesatz bei tiefen Colliculusneuronen und nicht retrograd markierten NOT-Neuronen nachgewiesen werden.

Beide Zellpopulationen verhalten sich im Hinblick auf die umliegende Terminalenverteilung sehr ähnlich: sowohl

nicht markierte NOT-Zellen als auch tiefe Colliculusneurone weisen auf der sie unmittelbar umgebenden 5 μ m breiten Innenzone signifikant mehr Terminalen auf (Fläche x , unmarkierte NOT-Zelle: 7.276 Terminalen/100 μ m²; tiefe Colliculuszelle: 8.043 Terminalen/100 μ m²) als auf der Vergleichszone mit 5 bis 10 μ m Abstand von der Zellmembran (Fläche a , unmarkierte NOT-Zelle: 5.396 Terminalen/100 μ m²; tiefe Colliculuszelle: 5.517 Terminalen/100 μ m²).

Die Anzahl direkt kontaktierender Terminalen beträgt bei unmarkierten NOT-Zellen 10.25 Terminalen/100 μ m Zellmembran, bei tiefen Colliculuszellen 11.19 Terminalen/100 μ m Zellmembran.

Möglichkeiten des Einflusses inhibitorischer Synapsen auf die Funktion der verschiedenen Zellpopulationen wurden diskutiert.

Summary

Immunocytochemical Studies of GABAergic Structures in the Mesencephalic Pretectum of the Cat

In this study the distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) containing nerve terminals around cells in cat's nucleus of the optic tract (NOT) and superior colliculus (SC) was investigated quantitatively.

Direction-selective neurons in the NOT and cells in the deeper layers of the SC were retrogradely labeled by means of horseradish peroxidase (HRP) stereotaxically injected to the inferior olive (IO).

GABA-positive cell structures were shown immunocytochemically in semithin sections (1 μ m) using the 'post-embedding' method.

Retrogradely labeled neurons and GABA-immunoreactive cell elements could be demonstrated in the same histological prepare simultaneously applying a modified double-label method.

The NOT-projection neurons were only rarely associated with GABA-positive terminals (0.357 terminals/100 μ m cell membrane). An area surrounding the soma (width: 5 μ m) was characterized by containing significantly less terminals (density: 0.622 terminals/100 μ m²) than a control area (distance: 5-10 μ m; density: 2.628 terminals/100 μ m²).

Only 50% of the proximal dendrites show this significant difference between the two areas (0-5 μ m: 1.263 terminals/100 μ m²; 5-10 μ m: 2.42 terminals/100 μ m²).

The proximal dendrites were contacted by significantly more GABA-positive terminals than the somata (1.106 terminals/100 μ m cell membrane).

In contrast to that, the somata of unlabeled, GABA-negative NOT-cells were densely surrounded with GABA-positive terminals (unlabeled NOT-cells: 0-5 μ m: 7.276 terminals/100 μ m², 5-10 μ m: 5.396 terminals/100 μ m²; labeled

SC-cells: 0-5 μ m: 8.043 terminals/100 μ m², 5-10 μ m: 5.517 terminals/100 μ m²).

In these cells the density of terminals was significantly higher in the distance from 0-5 μ m than from 5-10 μ m. The number of contacting terminals also was significantly higher in unlabeled NOT-cells (10.25 terminals/100 μ m cell membrane) and in deep SC-cells (11.19 terminals/100 μ m cell membrane) than in NOT-projection-neurons.

The possible influence of inhibiting synapses on the function of the different cell populations was discussed.

F AnhangRezepte

<u>Phosphatpuffer</u>	0.2m	pH 7.4
Lösung A	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	35.61g/1000ml
Lösung B	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	27.60g/1000ml

Lösung A 40.5 Teile

Lösung B 9.5 Teile

pH einstellen

Ringerlösung

9g NaCl

1g Procain

in 1000ml H_2O , auf 37°C erwärmen

Fixierlösungen

Lösung A: 210 ml H_2O auf 70°C erwärmen (Bunsenbrenner),
 4 Tropfen 40%ige NaOH dazugeben
 Lösung auf erwärmten Rührer (70°C) stellen
 Paraformaldehyd langsam dazugeben, vorsichtig
 rühren
 10-15 min auf der Heizplatte stehen lassen
 dann auf Eis stellen

Lösung B: 480 ml 0.2m Phosphatpuffer, pH 7.4
250 ml H₂O zugeben bzw. auf 1000ml auffüllen
auf Eis stellen

Lösung C: Glutaraldehyd, eisgekühlt

Fixierlösung 1: 10g Paraformaldehyd
50 ml 25%iges Glutaraldehyd
Fixierlösung 2: 20g Paraformaldehyd
8.05 ml 25%iges Glutaraldehyd
Die Mengenangaben beziehen sich auf 1000ml
Fixierlösung, für eine Katze benötigt man
ca. drei Liter.

Meerrettich-Peroxidase-Nachweis (Doppelmarkierung):

1. TMB-Reaktion (modifiziert nach Mesulam, 1978)

Citrat-Puffer 0.2n pH 3.3
für 500ml: - 29.4g Na-Citrat
- 218 ml 25%ige HCl
- 282 ml H₂O bidest

a) Schnitte 2-3x in eiskaltem H₂O bidest waschen

b) **Präeinkubation** (20 min auf dem Schüttler bei
Raumtemperatur):

Lösung A für 100 ml: - 100 mg Na-Nitroferricyanad
- 92.5 ml H₂O bidest
- 5 ml 0.2n Citratpuffer, pH 3.

Lösung B für 100 ml: - 5mg TMB
- 2.5 ml Ethanol absolut
auf 50°C erwärmen, bis das TMB gelöst ist

Lösungen stets frisch ansetzen; kurz vor Gebrauch beide
Lösungen zusammengeben

c) **Hauptinkubation** (30-40 min auf dem Schüttler, zusätzlich
mit N₂ durchlüften):

Lösung A und B wie oben, mischen

Intensivierung nach Itoh et al. (1979) mit:

- 200 mg D-Glucose
- 40 mg NH₄CL
- 0.5 mg Glucose-Oxidase

Die Mengenangaben beziehen sich auf 100ml
Inkubationsmedium, ggfs. erneut ansetzen

2. Stabilisator (10-20 min bei 4°C)

für 100 ml: - 5g Ammoniumheptamolybdat
- 100 ml H₂O bidest

3. Schnitte 30 sec in 0.1m Phosphatpuffer spülen

4. DAB/CoCl₂-Stabilisierung (nach Rye et al., 1984)

- für 100 ml: - 50 mg DAB in 100 ml 0.1m
 Phosphatpuffer, pH 7.4
- unter Rühren tropfenweise 2.5 ml
 einer 1%igen CoCl₂-Lösung zugeben
 - filtrieren
 - 30 µl H₂O₂ (30%) dazugeben
- Schnitte 5 min inkubieren

5. Schnitte 5x in 0.01m PBS (pH 7.5) spülen

6. Heraustrennen der für die Immuncytochmie vorgesehenen
 Areale

Harzstufen und Einbettung (Post-Embedding-Methode)

1. Entwässerung der Gewebeblöckchen:

50% Ethanol absolut:	5 min
70% " "	: 20 - 40 min oder über Nacht
70% " "	: noch mal spülen
80% " "	: 20 - 30 min
90% " "	: 20 - 30 min
100% " "	: 20 - 30 min
100% " "	: 20 - 30 min
100% Aceton p.a.	: 20 - 30 min
100% " "	: 20 - 30 min

2. Harzgemisch (für 100 ml):

A: Epon 812	19 Teile	B: Epon 812	24 Teile
DDSA	31 Teile	MNA	26 Teile

beide Komponenten zu gleichen Volumen gut mischen

Epon Beschleuniger DMP 30 1.5%

3. Harzstufen

1. Harzgemisch und Aceton 1 : 3 30 min
2. Harzgemisch und Aceton 1 : 2 45 min
3. Harzgemisch und Aceton 3 : 1 60 min
4. Harzgemisch + 1.5% Beschleuniger(s.o.) über Nacht bei 20°C im Exsikkator evakuieren
5. neues Harzgemisch + 1.5% Beschleuniger, einbetten und beschriften
6. bei 60°C 48h polymerisieren

4. Zutrimmen der Gewebelöckchen und Anfertigung der Semidünnschnitte

Entharzung der Semidünnschnitte vor der Immunocytochemie

1. Natrium-Methylat: 25 sec
2. Methanol-Benzol (1:1): 30 sec
3. Aceton (100%): 3 x 30 sec
4. Aceton (50%): 30 sec
5. H₂O bidest: kurz spülen
6. PBS (s.u.)

Pufferlösungen für die Immuncytochemie:

a) Phosphatpuffer mit NaCl (PBS) 0.01m pH 7.5

für 2l: - 0.4 g NaH_2PO_4
 - 2.75g Na_2HPO_4
 - 17.6g NaCl

mit H_2O bidest auf 2l auffüllen, pH einstellen

b) Tris-Puffer mit NaCl (TBS) 0.05m pH 7.6

für 1l: - 100 ml Tris-HCl-Stammlösung 0.5m (s.u.)
 - 9g NaCl
 - 900 ml H_2O bidest

Tris-HCl-Stammlösung 0.5m pH 7.6

für 1l: - 60.57g Tris
 - 800 ml H_2O bidest
 - pH einstellen mit 25%iger HCl
 - auffüllen auf 1000 ml

Immunocytochemie an Semidünnschnitten (nach der Entharzung)

1. Spülen in PBS 3 x 1 min RT
2. 10% Methanol / 3% H₂O₂ in PBS 15 min RT
(Blockierung endogener Peroxidasen)
3. Spülen in PBS (s.o.)
4. 10% NSS in PBS (+0.05% Natriumazid) 30 min RT
(Absättigung unspezifischer Bindungsstellen)
5. 1. Antikörperverdünnung (Anti-GABA-Serum vom Kaninchen), Verdünnung 1 : 4000 od. darunter, in 5% NSS (in PBS + 0.05% Natriumazid) 36h/4°C
6. Spülen in PBS (s.o.)
7. 2. Antikörperverdünnung (swine-IgG to rabbit-IgG), Verdünnung 1:100 in 5% NSS (in PBS + 0.05% Natriumazid) 2h/RT
8. Spülen in PBS (s.o.)
9. Einführung des PAP-Komplexes (PAP vom Kaninchen), Verdünnung 1:50 in 5% NSS (in PBS + 0.05% Natriumazid) 2h/RT
10. Spülen in PBS (s.o.)
11. Pufferwechsel zu TBS 3 x 1 min RT
12. DAB-Reaktion:
auf 500 ml 0.05m TBS 250 mg DAB 5 min/35°C
Hauptinkubation durch Zugabe von 70µl H₂O₂ 10 min/35°C
13. Spülen in TBS 3 x 1 min RT
14. aufsteigende Alkoholreihe
15. Xylol
16. Eindeckeln (Depex)

G Literaturverzeichnis

Adams J.C., 1977: Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. *Neurosci.* 2: 141-145

Ahlsen G., Lindström S., 1978: Projection of perigeniculate neurons to the lateral geniculate body in the cat. *Neurosci. Lett. Suppl.* 1: 367-372

Alger B.E., Nicoll R.A., 1982: Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptors on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J. Physiol. (London)* 328: 125-141

Avendano C., Juretschke M.A., 1980: The pretectal region of the cat: a structural and topographical study with stereotaxis coordinates. *J. comp. Neurol.* 193: 69-88

Andrews P. R. , Johnston G. A. R., 1979: Commentary GABA-agonists and antagonists. *Biochemical Pharmacol.* 28: 2697-2702

Ballas I., Hoffmann K.P., Wagner H.J., 1981: Retinal projection to the nucleus of the optic tract in the cat as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neurosci. Lett.* 26: 197-202

Ballas I., Hoffmann K.P., 1985: A correlation between receptive field properties and morphological structures in the pretectum of the cat. *J. comp. Neurol.* 238: 417-428

Barker J.L., MacDonald J.F., Mathers D.A., McBurney, R.N., Oertel W., 1981: In: De Feudis F.V., Mandel P. (eds.): Amino acid neurotransmitters. Raven Press, New York

Barlow H. B., Levick W. R., 1965: The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. J. Physiol. 178: 477-504

Barmack N.H., Simpson J.J., 1980: Effects of microlesions of dorsal cap of inferior olive of rabbits on optokinetic and vestibulo-ocular reflexes. J. Neurophysiol. 43: 182-206

Beaumont K., Chilton W.S., Yamamura H.I., Enna S.I., 1978: Muscimol binding in rat brain: association with synaptic GABA receptors. Brain Res. 148: 153

Berger B., Nguyen-Legros J., Thierry A.M., 1978: Demonstration of horseradish peroxidase and fluorescent catecholamines in the same neuron. Neurosci. Lett. 9: 297-302

Berman A.L., 1968: The brain stem of the cat. The University of Wisconsin Press.

Berninghaus H., 1986: Ivermectin-Intoxikation bei einem Collie. Der Prakt. TA 7: 575-577

Berson D.M., Graybiel A.M., 1980: Some cortical and subcortical fiber projections to the accessory optic nuclei in the cat. Neurosci. 5: 2203-2217

Bjorklund A., Skagerberg G., 1979: Simultaneous use of retrograde fluorescent tracers and fluorescence histochemistry for convenient and precise mapping of monoaminergic projections and collateral arrangements in

the CNS. J. Neurosci. Meth. 1.: 261-277

Blanks R.H.I., Giolli R.A., Pham S.V., 1982: Projections of the medial terminal nucleus of the accessory optic system upon pretectal nuclei in the pigmented rat. Exp. Brain Res. 48: 228-237

Blessing W.W., Furness J.B., Costa M., Chalmers J.P., 1978: Localisation of catecholamine fluorescence and retrogradely transported horseradish peroxidase within the same nerve cell. Neurosci. Lett. 9: 311-315

Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A.L., 1983: Characteristic of GABA_B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. Br. J. Pharmacol. 78: 191-206

Bowker R.M., Westlund K.N., Sullivan M.C., Coulter J.D., 1982: A combined retrograde transport and immunocytochemical staining method for demonstrating the origins of serotonergic projections. J. Histochem. Cytochem. 30: 805-810

Burchfield J.L., Duffy F.H., 1981: Role of intracortical inhibition in deprivation amblyopia reversal by microiontophoretic bicuculline. Brain Res. 206: 479-484

Brandon C., 1985: Improved immunocytochemical staining through the use of fab fragments of primary antibody, fab specific second antibody, and fab-horseradish peroxidase. J. Histochem. Cytochem. 33: 715-719

Brecha N., Karten H. H., 1979: Accessory optic projections upon oculomotor nuclei and vestibulo-cerebellum. Sci. 203:913-916

- Büttner-Ennever J.A., 1981: Vestibular-oculomotor organization. In: Fuchs and Becker (eds.), Progress in oculomotor research: 361-370
- Burnstock G., Costa M., 1975: Adrenergic neurons. Their organization, function and development in the peripheral nervous system. Chapman and Hall, London: 13-18
- Caldwell J.H., Daw N.W., Wyatt H.J., 1978: Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: lateral interactions for cells with more complex receptive fields. J. Physiol. 276: 277-298
- Cazin L., Precht W., Lannou J., 1980a: Pathways mediating optokinetic responses of vestibular nucleus neurons in the rat. Pflügers Arch. 384: 19-29
- Cazin L., Precht W., Lannou J., 1980b: Firing characteristics of neurons mediating optokinetic responses to rat's vestibular neurons. Pflügers Arch. 386: 221-230
- Cazin L., Precht W., Lannou J., 1980c: Optokinetic responses of vestibular nucleus neurons in the rat. Pflügers Arch. 384: 31-38
- Cazin L., Magnin M., Lannou J., 1982: Non-cerebellar visual afferents to the vestibular nuclei involving the prepositus hypoglossal complex: an autoradiographic study in the rat. Exp. Brain Res. 48: 309-313
- Chevalier G., Thierry A.M., Shibazaki T., Feger J., 1981: Evidence for a GABAergic inhibitory nigrotectal pathway in the rat. Neurosci. Lett. 21: 67-70

- Cohen B., Matsuo V., Raphan T., 1977: Quantitative analysis of the velocity characteristics of optokinetic nystagmus and optokinetic after nystagmus. *J. Physiol. Lond.* 270: 321-344
- Collewijn H., 1969: Optokinetic eye movements in the rabbit: input-output relations. *Vis. Res.* 9: 117-143
- Collewijn H., 1975a: Oculomotor areas in the rabbit's midbrain and pretectum. *J. Neurobiol.* 6: 3-22
- Collewijn H., 1975b: Direction-selective units in the rabbit's nucleus of the optic tract. *Brain Res.* 100: 489-508
- Collewijn H., Holstege G., 1984: Effects of neonatal and late unilateral enucleation on optokinetic responses and optic nerve projections in the rabbit. *Exp. Brain Res.* 57: 138-150
- Constanti A., 1978: The 'mixed' effect of picrotoxin on the GABA dose/conductance relation recorded from lobster muscle. *Neuropharmacology* 17: 159-167
- Cynader M., Hoffmann K.P., 1981: Strabismus disrupts binocular convergence in cat nucleus of the optic tract. *Dev. Brain Res.* 1: 132-136
- Dubin M.W., Cleland B.G., 1977: Organization of visual inputs to interneurons of the lateral geniculate nucleus of the cat. *J. Neurophysiol.* 40: 410-427
- Dunlap K., 1981: Two types of GABA receptors on embryonic sensory neurones. *Br. J. Pharmacol.* 74: 579-585

- Evinger C., Fuchs A.F., 1978: Saccadic, smooth pursuit and optokinetic eye movements of the trained cat. J. Physiol. Lond. 285: 209-229
- Faigle J.W., Keberle H., 1972: In: W. Birkmayer (ed.): Hans Huber Publications, Vienna. Spasticity - a topical survey: 94
- Fonnum F., Walberg F., 1973: An estimation of the concentration of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in the inhibitory Purkinje axon terminals in the cat. Brain Res. 54: 115-127
- Fredrickson R. C. A., 1977: Enkephalin pentapeptides: a review of current evidence for a physiological role in vertebrate neurotransmission. Life Sci. 21: 23-41
- Fujii M., Kusama T., 1984: Fixation of horseradish peroxidase reaction products with ammonium molybdate. Neurosci. Res. 1.: 153-156
- Fukuda Y., Stone J., 1974: Retinal distribution and central projections of Y-, X- and W-cells of the cat's retina. J. Neurophysiol. 37: 759-772
- Giolli R. A., Peterson G. M., Ribak C. E., McDonald H. M., Blanks R. H. I., Fallon J. H., 1985: Gabaergic neurones comprise a major cell type in rodent visual relay nuclei: an immunocytochemical study of pretectal and accessory optic nuclei. Exp. Brain Res. 61: 194-203
- Graham R.C., Karnowski M.J., 1966: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14: 291-302

- Grasse K.L., Cynader M.S., 1982: Electrophysiology of medial terminal nucleus of accessory optic system in the cat. J. Neurophysiol. 48: 490-504
- Grasse K.L., Cynader M.S., 1984: Electrophysiology of the lateral and dorsal terminal nucleus of the cat accessory optic system. J. Neurophysiol. 51: 267-293
- Guidotti A., Toffano G., Costa E., 1978: An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. Nature, Lond. 275: 553-555
- Hahn F., 1960: Analeptics. Pharmacol. Rev. 12: 447-530
- Hanker J.S., Yates P.E., Metz C.B., Rustioni A., 1977: A new specific sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. J. Histochem. 9: 789-792
- Hardy P.M., Nicholls A.C., Rydon H.N., 1976: The nature of the crosslinking of proteins by glutaraldehyde with the amino groups of 6-aminohexanoic acid and α -N-acetyllysine. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 9: 958-962
- Harrison N.L., Simmonds M.A., 1983: The picrotoxin-like action of convulsant benzodiazepine Ro2-3663. Eur. J. Pharmacol 87: 155-158
- Hayhow W.R., Webb C., Jervie A., 1960: The accessory optic fiber system in the rat. J. comp. Neurol. 115: 187-215
- Hendrickson A.E., Hand S.P., Wu J.Y., 1981: Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in monkey striate cortex. Nature 292: 605-607

- Hendry S.C.H., Jones E.G., 1981: Sizes and distributions of intrinsic neurons incorporating tritiated GABA in monkey sensorimotor cortex. *J. Neurosci.* 4: 390-408
- Hendry S.C.H., De Felipe J., Jones E.G., 1984: Peptide-like immunoreactivity coexists with glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in neurones of cat and monkey cerebral cortex. *Soc. Neurosci. Abstr.* 10: 693
- Hess, J., 1941: Über die Wechselwirkung verschiedener Analeptika bei der Alkohol- und Chloralose-Narkose. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 197: 204-209
- Hoffmann K.P., Schoppmann A., 1975: Retinal input to direction-selective cells in the nucleus tractus opticus of the cat. *Brain Res.* 99: 359-366
- Hoffmann K.P., Behrend K., Schoppmann A., 1976: A direct afferent visual pathway from the nucleus of the optic tract to the inferior olive in the cat. *Brain. Res.* 115: 150-153
- Hoffmann K.P., 1981: Neuronal responses related to optokinetic nystagmus in the cat's nucleus of the optic tract. In Fuchs and Becker (eds): *Progress in Oculomotor Research*: 443-454
- Hoffmann K.P., Schoppmann A., 1981: A quantitative analysis of the direction-specific responses of neurons in the cat's nucleus of the optic tract. *Exp. Brain Res.* 42: 146-157
- Hoffmann K.P., 1983a: Control of the optokinetic reflex by the nucleus of the optic tract in the cat. In: Hein A., Jeannerod M. (eds.): *Spatially oriented behavior*. Springer, New York: 135-153

- Hoffmann K.P., 1983b: Effects of early monocular deprivation on visual input to the cat nucleus of the optic tract. *Exp. Brain Res.* 51: 236-246
- Hoffmann K.P., Bauer R., Huber H.P., Mayr M., 1984: Single cell activity in area 18 of the cat's visual cortex during optokinetic nystagmus. *Exp. Brain Res.* 57: 118-127
- Hoffmann K.P., Stone J., 1985: Retinal input to the nucleus of the optic tract of the cat assessed by antidromic activation of ganglion cells. *Exp. Brain Res.* 59: 395-403
- Hoffmann K.P., Distler C., 1986: The role of direction-selective cells in the nucleus of the optic tract of cat and monkey during optokinetic nystagmus. In: Keller E.L., Zee D.S. (eds.), *Adaptive processes in visual and oculomotor systems.*
- Hoffmann K.P., 1987: The influence of visual experience on the ontogeny of the optokinetic reflex in mammals. In: Rauschecker J., Marler P. (eds.), *Imprinting and cortical plasticity.* Wiley, New York.
- Holstege G., Collewyn H., 1982: The efferent connections of the nucleus of the optic tract and the superior colliculus in the rabbit. *J. comp. Neurol.* 209: 139-175
- Horn A. K. E., Hoffmann K.P., 1987: Combined GABA-immunocytochemistry and TMB-HRP histochemistry of pretectal nuclei projecting to the inferior olive in rats, cats and monkeys. *Brain Res.* 409: 133-138
- Itoh K., Konishi A., Nomura S., Mizuno N., Nakamura Y., Sugimoto T., 1979: Application of coupled oxidation

reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. Brain Res. 175: 341-346

Iversen L.L., Michell J.F., Srinivasan V., 1971: The release of gamma-aminobutyric acid during inhibition in the cat visual cortex. J. Physiol. 212: 519-534

Iversen L.L., Kelly J. S., 1975: Uptake and metabolism of gamma-aminobutyric acid by neurons and glial cells. Biochem. Pharmacol. 24:933-938

Iversen L. L., 1979: The chemistry of the brain. Sci. Am. 241: 118-129

Johnston G.A.R., 1978: Neuropharmacology of amino acid inhibitory transmitters. A. Rev. Pharmac. Toxic. 18: 269-289

Johnston G.A.R., Kennedy S.M.E., 1978: In: F.Fonnum (ed.): Amino Acids as chemical transmitters. Plenum Press, New York: 507

Johnston G.A.R., Curtis D.R., de Groat W.C., Duggan A.W., 1968: Central action of ibotenic acid and muscimol. Biochem. Pharmac. 17, 2488

Kanaseki T., Sprague J.M., 1974: Anatomical organization of pretectal nuclei and tectal laminae in the cat. J. comp. Neurol. 158: 319-338

Keller E.L., Precht W., 1979: Visual-vestibular responses in vestibular nuclear neurons in intact and cerebellectomized, alert cat. Neurosci. 4: 1599-1613

- Krnjevic K., 1974: Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54: 418-540
- Kypers H.G.J.M., Catsman-Berrevoets C.E., Pault R.L., 1977: Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain. *Neurosci. Letters* 6: 127-135
- Lannou J., Cazin L., Precht W., LeTaillanter M., 1984: Responses of prepositus hypoglossi neurons to optokinetic and vestibular stimulations in the rat. *Brain Res.* 301: 39-45
- Le Vay S., 1973: Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. *Electron microscopy of Golgi preparations.* *J. comp. Neurol.* 150: 35-86
- Lindström S., 1982: Synaptic organization of inhibitory pathways to principal cells in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Brain Res.* 234: 447-453
- Lister R. G., Nutt D. J., 1987: Is RO 15-4513 a specific alcohol antagonist? *Trends Neurosci.* 6: 223-225
- Ljungdahl A., Hökfelt T., Goldstein M., Park D., 1975: Retrograde peroxidase tracing of neurons combined with transmitter histochemistry. *Brain Res.* 84: 313-319
- Lu S. M., Lin C. S., Behan M., Cant N. B., Hall W. C., 1985: Glutamate decarboxylase reactivity in the intermediate gray layer of the superior colliculus in the cat. *Neurosci.* 16: 123-131
- Maekawa K., Simpson J.I., 1972: Climbing fiber activation of purkinje cells in the flocculus by impulses transferred through the visual pathway. *Brain Res.* 39: 245-251

- Maekawa K., Simpson J.I., 1973: Climbing fiber responses evoked in vestibulo cerebellum of rabbit from visual system. *J. Neurophysiol.* 36: 649-666
- Maekawa K., Takeda T., Kimura M., 1985: Responses of the nucleus of the optic tract neurons projecting to the nucleus reticularis tegmenti pontis upon optokinetic stimulation in the rabbit. *Neurosci. Res.* 2:1-25
- Magnin L., Courjon J.H., Flandrin J.M., 1983: Possible visual pathways to the cat vestibular nuclei involving the nucleus prepositus hypoglossi. *Exp. Brain Res.* 51: 283-303
- Markner C., Hoffmann K.P., 1985: Variability in the effects of monocular deprivation on the optokinetic reflex of the non-deprived eye in the cat. *Exp. Brain Res.* 61: 117-124
- Mathers D.A., Barker J.L., 1980: Pentobarbital opens ion channels of long duration in cultured mouse spinal neurones. *Science* 209: 507-509
- Matute C., Streit P., 1986: Monoclonal antibodies demonstrating GABA-like immunohistochemistry. *Histochemistry* 86: 147-157
- Mesulam M.M., 1978: Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reactionproduct with superior sensivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.* 26: 106-117
- Möhler H., Okada T., 1977: Benzodiazepine receptors: demonstration in the CNS. *Science* 198: 849-851

- Möhler H., Okada T., Enna S.J., 1978: Benzodiazepine and neurotransmitter binding in rat brain after chronic administration of diazepam or phenobarbital. *Brain Res.* 156: 391-395
- Montero V. M., Singer W., 1984: Ultrastructure and synaptic relations of neural elements containing glutamic acid decarboxylase (GAD) in the perigeniculate nucleus of the cat: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Exp. Brain Res.* 56: 115-125
- Montero V.M., 1986: The interneuronal nature of GABAergic neurons in the lateral geniculate nucleus of the rhesus monkey: a combined HRP and GABA-immunocytochemical study. *Exp. Brain. Res.* 64: 615-622
- Montero V.M., Zempel J., 1985: Evidence for two types of GABA-containing interneurons in the A-laminae of the cat lateral geniculate nucleus: a double-label HRP and GABA-immunocytochemical study. *Exp. Brain Res.* 60: 603-609
- Montero V. M., Zempel J., 1986: The proportion and size of GABA-Immunoreaktive neurones in the magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus of the rhesus monkey. *Exp. Brain Res.* 62: 215-223
- Mugnaini E., Oertel W.H., 1985: An atlas of the distribution of gabaergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD-immunohistochemistry. In: Björklund A., Hökfelt T. (eds.): *Handbook of chemical neuroanatomy 4: GABA and neuropeptides in the CNS, Part 1*
- Myashita Y., Ito M., Jastreboff P.J., Maekewa K., Nagao S., 1980: Effect of eye movements of rabbits induced by severance of mossy fiber visual pathway to the

cerebellar flocculus. Brain Res. 198: 210-215

Nistri A., Constanti A., 1979: Pharmacological characterization of different types of GABA- and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. Prog. Neurobiol. (Oxford) 13: 117-235

Nistri A., Corradetti R., 1978: A comparison of the effects of GABA, 3-aminopropanesulphonic acid and imidazoleacetic acid on the frog spinal cord. Neuropharmacology 17: 13-19

Oertel W.H., Mugnaini E., Schmechel D. E., Tappaz M.L. Kopin I.J., 1982: The immunocytochemical demonstration of gamma-amino-butyric acid-ergic neurons methods and application. In: Chan-Palay V., Palay S.L., (eds.) Cytochemical methods in neuroanatomy. Alan R Liss, New-York 297-329

Olucha F., Martinez-Garcia F., Lopez-Garcia C., 1985: A new stabilizing agent for the tetramethylbenzidine (TMB) reaction product in the histochemical detection of horseradish peroxidase (HRP). J. Neurosci. Meth. 13: 131-138

Olsen R. W., Venter J. C., (eds.) 1986: Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties. Liss, New York

Olsen R.W., 1981: GABA-benzodiazepine-barbiturate-receptor interactions. J. Neurochem. 37:1-13

Ottersen O. P., Storm-Mathisen J., 1984: GABA containing neurons in the thalamus and pretectum of the rodent. Anat. Embryol. 170: 197-207

- Ottersen O.P., Storm-Mathisen J., 1984: Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J. comp. Neurol.* 229: 374-392
- Ottersen O.P., Storm-Mathisen J., 1987: Localization of amino acid neurotransmitters by immunocytochemistry. *Trends Neurosci.* 6: 250-255
- Oyster C.W., Barlow H.B., 1967: Direction-selective units in rabbit's retina: distribution of preferred directions. *Science* 155: 841-842
- Penny G. R., Fitzpatrick D., Schmechel D. E., Diamond I. T., 1983: Glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neurones and horseradish peroxidase labeled projection neurones in the ventral posterior nucleus of the cat and galago senegalensis. *J Neurosci.* 3: 1868-1887
- Pickel V. M., 1981: Immunocytochemical methods. In Heimer L., Robard M. J. (eds.): *Neuroanatomical tract-tracing methods*. Plenum Press: 383-509
- Polc P., Bonetti E. P., Schaffner R., Haefely, W. 1982: A 3-state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine tranquilizers, β -carbolines and phenobarbitone. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* 321:260-264
- Precht W., Strata P., 1980: On the pathway mediating optokinetic responses in vestibular nuclear neurons. *Neurosci.* 5: 777-787
- Precht W., 1981: Functional organisation of optokinetic pathways in mammals. In: Fuchs and Becker (eds.), *Progress in oculomotor Research*: 425-433

- Ribak C.E., 1978: Aspinous and sparsely-spinous stellate neurones in the visual cortex of rats contain glutamic decarboxylase. J. Neurocytol. 7: 461-478
- Ribak C.E., Vaughn J.E., Roberts E., 1979: The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunohistochemistry. J. comp. Neurol. 187: 261-284
- Ribak C.E., Vaughn J.E., Barber R.P., 1981: Immunocytochemical localization of GABAergic neurone at the electron microscopical level. Histochem J. 13: 555-582
- Roberts P.J., Gupta H.K., Shargill N.S., 1978: The interaction of baclofen (beta-(4-chlorophenyl)Gaba) with GABA systems in the rat brain: evidence for releasing action. Brain Res. 155: 209
- Rolle M., Mayr A. (eds.) 1978: In: Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke, Stuttgart: 57-58
- Rosenquist A. C. und Palmer L. A., 1971: Visual receptive field properties of cells in the superior colliculus after cortical lesions in the cat. Exp. Neurol. 33: 629-652
- Rye D.B., Saper C.B., Wainer B.H., 1984: Stabilization of the tetramethylbenzidine (TMB) reaction product: Application for retrograde and anterograd tracing, and combination with immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem. 32: 1145-1153
- Sato H., Tsumoto T., 1984: GABAergic inhibition already operates on a group of neurons in the kitten visual

cortex at the time of eye opening. Dev Brain Res. 12: 311-315

Scalia F., 1972: The termination of retinal axons in the pretectal region of mammals. J. comp. Neurol. 145: 223-257

Scalia F., Arango V., 1979: Topographic organization of the projections of the retina to the pretectal region in the rat. J. comp. Neurol. 186: 271-292

Schofield P. R., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. R., Stephenson F. A., Rodriguez H., Rhee L. M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T. A., Seeburg P. H., Barnard E. A., 1987: Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. Nature 328:221-227

Schoppmann A., Hoffmann K.P., 1979: A comparison of visual responses in two pretectal nuclei and in the superior colliculus of the cat. Exp. Brain Res. 35: 495-510

Schoppmann A., 1981: Projections from areas 17 and 18 of the visual cortex to the nucleus of the optic tract. Brain Res. 223: 1-17

Sekiya H., Kawamura K., 1985: An HRP study in the monkey of olivary projections from the mesodiencephalic structures with particular reference to pretecto-olivary neurons.

Siesjö B. K., 1978: Brain energy metabolism. Wiley & Sons, New York, Toronto: 168-172

Sillito A.M., 1975: The contribution of inhibitory mechanisms to the receptive field properties of neurons

in the striate cortex of the cat. J. Physiol. 250: 305-329

Sillito A.M., 1977: Inhibitory processes underlying the directional specificity of simple, complex and hypercomplex cells in the cat's visual cortex. J. Physiol. 271: 699-720

Sillito A.M., 1979: Pharmacological approach to the visual cortex. Trends Neurosci. 7: 196-199

Simmonds M.A., 1980: A site for the potentiation of GABA-mediated responses by benzodiazepines. Nature 284: 558-560

Simmonds M. A., 1983: Multiple GABA-receptors and associated regulatory sites. Trends Neurosci. 7.:279-281

Simpson J.J., Soodak R.E., 1978: The accessory optic system: a visual system in vestibular coordinates: Neurosci. Abs. 4: 645

Simpson J.J., Soodak R.E., Hess R., 1979: The accessory optic system and its relation to the vestibulocerebellum. In: Granit R., Pompeiano O. (eds.): Reflex control of posture and movement. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. Progress in Brain Res. 50: 175-724

Somogyi P., Freund T.F., Kisvarday Z.F., 1984: Different types of ^3H -GABA accumulating neurones in the visual cortex of the rat. Exp. Brain Res. 54: 45-56

Somogyi P., Hodgson A.J., Chubb I.W., Penke B., Erdei A., 1985: Antisera to gamma-aminobutyric acid. II. Immunocytochemical application to the central nervous system. J. Histochem. Cytochem. 33: 240-248

- Sternberger L. A., 1979: Immunocytochemistry, 2nd edn., Wiley & Sons, New York
- Storm-Mathisen J., Leknes A.K., Bore A.T., Vaaland J.L., Edminson P., Haug F-M.S., Ottersen O.P., 1983: First visualisation of glutamate and GABA in Neurones by immunocytochemistry .Nature 301: 517-520
- Strong N.P., Malach R., Lee P., van Sluyters R.C., 1984: Horizontal optokinetic nystagmus in the cat: recovery from cortical lesions. Dev. Brain. Res. 13: 179-192
- Study R.E., Barker J.L., 1981: Diazepam and pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of GABA responses in cultured central neurons. Proc. Natl Acad. Sci. USA 78: 7180-7184
- Suzdak P., Glowa J.R., Crawley J.N., Schwartz R.D., Skolnick P., Paul S.M., 1986: A selective benzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. Science 234, 1243-46
- Snyder S. H., 1975: Aminoacid neurotransmitters: Biochemical pharmacology. In: D. B. Tower (ed.), Raven Press, New York, The Nervous System 1: 355-361
- Takahashi E.S., Oyster C.W., 1980: Comparison of primary retinal projections and retinal ganglien cell size between pigmented and albino rabbits. Neurosci. Abst. 6: 348
- Terasawa K., Otani K., Yamada J., 1979: Descending pathways of the nucleus of the optic tract in the rat. Brain Res. 173: 405-417
- Ticku M.K., Van Ness P.C., Haycock J.W., Levy W.B., Olsen R.W., 1978: Dihydropicrotocolin binding sites in rat

brain: a comparison to GABA receptores. Brain Res. 150: 642

Toffano G., Guidotti A., Costa E., 1978: Purification of an endogenous protein inhibitor of the high affinity binding of gamma-aminobutyric acid to synaptic membranes of rat brain. Proc. natn. Acad. Sci. USA 75, 4024

Torre V., Poggio T., 1978: A synaptic mechanism possibly underlaying directional selectivity to motion. Prog. R. Soc. Lond. 202: 409-416

Tsumoto T., Eckart W., Creutzfeldt O.D., 1979: Modification of orientation sensivity of cat visual cortex neurons by temporal GABA mediated inhibition. Exp. Brain Res. 34: 351-363

Wainer B.H., Rye D.B., 1984: Retrograde horseradish peroxidase tracing combined with localisation of choline acetyltransferase immunoreactivity. J. Histochem. Cytochem. 32: 439-443

Walberg F., Nordby T., Hoffmann K.P., Hollaender H., 1981: Olivary afferents from the pretectal nuclei in the cat. Anat. Embryol. 161: 291-304

Weber J. T., Harting J. K., 1980: the efferent projections of the pretectal complex: an autoradiographic and horseradish peroxidase analysis. Brain Res. 194: 1-28

Weber J. T., Chen I-Li, 1984: GAD-immunoreactivity in the pretectal complex of the cat. Soc. Neurosci. Abstr. 10: 576

- Wenthold R.J., Zempel J.M., Parakkal M.H., Reeks K.A., Altschuler R.A., 1986: Immunocytochemical localization of GABA in the cochlear nucleus of the guinea pig. Brain Res. 380: 7-18
- Werner H. W., 1939: Comparative study of stimulant analeptics picrotoxin, nitrazol and coramine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 66: 39
- Wickelgreen G. B., Sterling P., 1969: Influence of visual cortex on receptive fields in the superior colliculus of the cat. J. Neurophysiol. 32: 16-23
- Wolf W., Hicks T.P., Albus K., 1986: The contribution of GABA-mediated inhibitory mechanisms to visual response properties of neurons in the kitten's striate cortex. J. Neurosci. 10: 2779-2798
- Wood C.C., Spear R.D., Braun J.J., 1973: Direction-specific deficits in horizontal optokinetic nystagmus following removal of visual cortex in the cat. Brain Res. 60: 231-237
- Wu J.-Y., Lin C.T., Brandon C., Chan T.S., Mohler H., Richards J.G., 1982: Regulation and immunocytochemical characterization of glutamic acid decarboxylase. In: Chan-Palay V., Palay S.L. (eds.): Cytochemical methods in neuroanatomy. Alan R. Liss, New York: 279-296

Lebenslauf

Name: S c h i l d k n e c h t
Vorname: Beate
Geburtstag: 01.07.1960
Geburtsort: Ulm/Donau
Wohnort: Bergstr. 6
7901 Staig/Steinberg
Eltern: Hans Schildknecht, Vertreter
Gerda Schildknecht, geb. Gaiser

Schulbesuch: 1966-1967: Volksschule Neu-Ulm/Offenhausen
1968-1970: Sägefild-Volksschule Wiblingen
Sep. 1970 bis Mai 1979: Hans und Sophie-
Scholl-Gymnasium, Ulm
Allgemeine Hochschulreife am 29.05.1979
Sep.'79 bis Mai '80: Beschäftigung bei der
Abteilung für Vergleichende Neurobiologie der
Universität Ulm als technische Angestellte
Mai'80 bis Aug.'80: Landwirtschaftliches
Praktikum auf einem Ausbildungsbetrieb in
Amstetten/Alb

Studium: Nov.'80 bis März '86: Studium der
Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Approbation als Tierarzt: am 18.04.1986

Berufliche Tätigkeit: seit März'84: Mitarbeit in einer
kurativen Kleintierpraxis; seit Mai '86:
wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der
Abteilung für Vergleichende Neurobiologie der
Universität Ulm. Im Rahmen dieser Tätigkeit
Anfertigung einer Dissertation.

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ulm, im Oktober 1987

Beate Schilke

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-P. Hoffmann für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung und Beratung.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. J.B. Walther, in dessen Abteilung ich meine Arbeit anfertigen durfte sowie allen Mitarbeitern der Abteilung für Vergleichende Neurobiologie der Universität Ulm für die sehr gute und angenehme Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. I. Reisert (Abteilung Klinische Morphologie der Universität Ulm) und bei Herrn Prof. Dr. R. Martin (Sektion Elektronenmikroskopie der Universität Ulm) für die freundliche Beratung bei der Erarbeitung der Methode und die großzügige Überlassung der Arbeitsplätze.

Für die technische Einweisung danke ich Frau E. Picca, Frau R. Zienecker und Herrn R. Kulka. Mein ganz persönlicher Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Mader für seine stets hilfreiche Unterstützung.

Für die Betreuung meiner Arbeit seitens der tiermedizinischen Fakultät in München möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. E. Dahme bedanken.

